

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Qualitative Analyse der retinalen Nervenfaserschicht
nach Durchtrennung des *Nervus opticus*
der adulten Albinoratte**

Ultrastruktureller Nachweis von intraretinalen Wachstumskegeln

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

eingereicht von

Anke Hoffmann

aus Belzig

Leipzig, 2000

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Jürgen Gropp
Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. habil. Johannes Seeger
Veterinär-Anatomisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. habil. Johannes Seeger
Veterinär-Anatomisches Institut

Prof. Dr. med. vet. habil. Heinz-Adolf Schoon
Veterinär-Pathologisches Institut

Prof. Dr. med. Dr. med. vet. habil. Fred Sinowatz
Institut für Tieranatomie II, Ludwig-Maximilian-Universität München

Tag der Verteidigung: 24.04.2001

*„ . . . the growth cone may be regarded as a sort of club or battering ram,
endowed with exquisite chemical sensitivity, with rapid ameboid movements, and
with a certain impulsive force, thanks to which it is able to proceed forward and
overcome obstacles met in its way, forcing apart cellular interstices
until it arrives at its destination.“*

aus: „Recollections of my life“
von Santiago Ramon y Cajal (1890)

All denen gewidmet,
die mir ihre wertvolle Hilfe und Unterstützung zuteil werden ließen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
2 Literaturübersicht	11
2.1 Degeneration im ZNS und PNS	11
2.2 Regeneration im ZNS und PNS.....	14
2.2.1 Der Wachstumskegel - eine an die Regeneration gebundene Struktur	14
2.2.2 Regeneration im PNS	16
2.2.3 Regenerationskapazitäten im ZNS.....	17
2.2.4 Einflussmöglichkeiten auf die ZNS-Regeneration	22
2.3 Die Retina und der <i>Nervus opticus</i>	24
2.3.1 Retina.....	24
2.3.2 <i>Nervus opticus</i>	26
2.4 Das retino-tektale System als Modell für Regeneration im ZNS.....	28
2.5 Markierungstechniken	31
3 Tiere, Material und Methoden	33
3.1 Versuchstiere und ihre Haltung.....	33
3.2 DiI-Markierung nicht axotomierter retinaler Ganglienzellen	33
3.3 Intraorbitale Quetschung des Sehnervs - <i>Nervus opticus-crush</i> (erster invasiver Eingriff).....	34
3.4 Intraorbitale Axotomie des Sehnervs (zweiter invasiver Eingriff)	35
3.5 Perfusionsfixierung.....	38
3.6 Präparation und Immersionsfixierung der Netzhaut.....	38
3.7 Lichtmikroskopische Darstellung der Nervenfaser- und Ganglienzellschicht	38
3.8 Grafische Darstellung ausgewählter Befunde	39
3.9 Elektronenmikroskopische Darstellung.....	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Lichtmikroskopische Befunde der Kontrollnetzhaut.....	41
4.2 Lichtmikroskopische Befunde der axotomierten Netzhaut.....	43
4.2.1 Schwellungen.....	44
4.2.2 Dornenförmige Fortsätze.....	46

4.2.3	Axonsprosse mit Wachstumskegeln.....	48
4.2.4	Axonkollateralen.....	54
4.2.5	Schleifenaxone.....	60
4.3	Elektronenmikroskopische Befunde der axotomierten Netzhaut.....	62
4.4	Schnittbildserie eines intraretinalen Wachstumskegels vier Wochen nach Läsion	70
5	Diskussion	73
5.1	Kritik der Methodik.....	73
5.1.1	Kontrollexperimente.....	73
5.1.2	Läsionsexperimente.....	74
5.1.3	Retinale Blutversorgung.....	77
5.2	Diskussion der Befunde	78
5.2.1	Kontrollexperimente.....	78
5.2.2	Läsionsexperimente.....	80
5.3	Warum sind zentrale Nervenzellen nur zu einer temporären Regeneration befähigt? ...	93
6	Zusammenfassung	97
7	Summary	99
8	Literaturverzeichnis	101

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>avidin-biotin-complex</i>
A.	Arteria
BDA	<i>biotinylated dextran amin</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
DAB	3,3' - D iaminobenzidin
DAC	<i>displaced amacrine cells</i>
DiI	1,1'- d ioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
ECM	<i>extracellular matrix</i>
FFS	Fluoreszenzfarbstoff
GAP-43	<i>growth-associated protein-43</i>
GCL	<i>ganglion cell layer</i>
GCV	<i>growth cone vesicle</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IL-1	I nterleukin-1
IN-1	<i>inhibiting neutralizing antibody-1</i>
IPL	<i>inner plexiform layer</i>
LY	L uzifer- Y ellow- C adaverin- B iotin
MGZ	M ikrogliazellen
MIF	<i>macrophage/microglia inhibiting factor</i>
MP	M akrophagen
M.	M usculus
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NO	<i>Nervus opticus</i>
NPF	<i>neurite promoting factors</i>
NTF-Konzept	<i>neurotrophic factor concept</i>

Abkürzungsverzeichnis

OPL	<i>outer plexiform layer</i>
PA	P araformaldehyd
PBS	<i>phosphate-buffered salt solution</i>
PNS	p eripheres N ervensystem
PP	P hosphat p uffer
rER	raues endoplasmatisches R etikulum
RGC	<i>retinal ganglion cells</i>
RNA	<i>ribose nuclein acid</i>
TF	T ranskriptionsfaktoren
TNF-α1	<i>tumor-necrose-factor-α1</i>
ÜLZ	Überlebenszeit
ZNS	Z entral n ervensystem

1 Einleitung

Verletzungen unterschiedlichster Genese des ausgereiften Zentralnervensystems (ZNS) von Säugetieren und Vögeln führen zu irreversiblen morphologischen und funktionellen Defiziten der geschädigten Neuronenpopulation. Die Proliferation von zentralen Nervenzellen findet hauptsächlich während der fetalen Entwicklung statt und nimmt signifikant mit wachsender Differenzierung des Gehirns und des Rückenmarks ab (CLEMENTE 1964). Es können nach einer Schädigung des ZNS keine neuen Neurone gebildet werden. So versteht man unter einer Regeneration im ZNS dieser Spezies Reparaturvorgänge, die das Überleben der betroffenen Neurone und eine erfolgreiche Regeneration der Nervenfasern gestatten.

Die regenerative Insuffizienz von Gehirn und Rückenmark bei Säugetieren und Vögeln (RAMON Y CAJAL 1928; WINDLE 1956) steht deutlich im Widerspruch zu den Fähigkeiten des peripheren Nervensystems (PNS) (RAMON Y CAJAL 1914; GUTH 1956; CARBONETTO et al. 1987) und zum ZNS phylogenetisch alter Wirbeltiere, wie z.B. dem der Fische und Amphibien (OORSCHOT und JONES 1990). Die Nervenfasern des PNS und des ZNS von Anamnioten sind nach einer vollständigen Durchtrennung in der Lage, an ihren verletzten Neuriten einen Wachstumskegel auszubilden und richtungsabhängig zu elongieren. Für das Gelingen einer regenerativen Antwort sind sie in einem zellulär wachstumspermissiven Milieu lokalisiert, das gute Regenerationsfähigkeiten ermöglicht. Im PNS kommt den SCHWANN-Zellen (SPEIDEL 1964; DUBOIS-DULCQ et al. 1981) und im ZNS von Fischen und Amphibien den zentralen Gliazellen (BASTMEYER et al. 1991; STROBEL und STUERMER 1994) eine essentielle regenerative Bedeutung zu.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Interpretation zentraler Regenerationsunfähigkeiten ist die gliale Umgebung der Neurone. Die Gliazellen des ZNS üben einen inhibitorischen Einfluss auf die Regeneration geschädigter zentraler Nervenzellen aus. Das wesenseigene Unvermögen des ZNS von Säugetieren und Vögeln zu regenerativen Leistungen ist nicht nur auf das alleinige Wirken zentraler Gliazellen zurückzuführen, vielmehr basiert die charakteristische Erscheinung auf einem synergistischen Wechselspiel mehrerer Faktoren. Der verwendete Begriff der Regeneration bezieht sich auf die funktionelle Regeneration im Sinne einer *Restitutio ad integrum*, d.h. das Erreichen eines Heilungsprozesses mit Wiederherstellung der Funktion.

Ein Großteil der Neurone im ZNS von Säugetieren und Vögeln unterliegt nach einer Axotomie ihrer Nervenfasern dem Zelltod, wobei eine kleine Population der überlebenden Zellen begrenzte Kapazitäten spontaner axonaler Regeneration aufweist. Dieses intrinsisch vorhandene Regenerationspotential konnte durch neuroprotektive Maßnahmen unterstützt und gefördert werden. Geschädigte zentrale Fasertrakte nutzten die überbrückenden peripheren Nerventransplantate und die in

ihnen vorherrschenden wachstumspermissiven Faktoren für eine gesteigerte Regeneration (SO und AGUAYO 1985; THANOS et al. 1989). Nach einer intravitrealen Implantation eines peripheren Nervensegmentes bei gleichzeitiger Durchführung einer intraorbitalen Axotomie des Sehnervs konnten in den Netzhäuten des adulten Goldhamsters zahlreiche aberrante Neubildungen in Form von axonähnlichen Fortsätzen (*axon-like processes*) an den retinalen Ganglienzellen (RGC) beobachtet werden (CHO und SO 1992).

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die differenzierte Analyse von intraretinalen Umstrukturierungsprozessen in der Nervenfaserschicht nach einer Axotomie des *Nervus opticus* (NO) der adulten Albinoratte. Die Untersuchungen beinhalteten das dokumentarische Erfassen aberranter Neubildungen an den retinalen Nervenfasern ohne den Einsatz neuroprotektiver Maßnahmen oder neurotropher Substanzen. Die Befunde sollen einen Rückschluss auf bestehende intrinsische Regenerationsfähigkeiten adulter retinaler Ganglienzellen (RGC) gestatten. Nach dem derzeitigen Verständnis neuronaler Reorganisation muss man davon ausgehen, dass die RGC, deren retinotektale Efferenzen durch die Axotomie irreversibel verloren sind, Kontakte mit neuen Innervationszielen in der Retina etablieren oder möglicherweise schon vorher existierende oder gebildete Axonkollaterale umstrukturieren.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf folgende Schwerpunkte:

- Durchführung einer intraorbitalen Axotomie zur Auslösung einer retrograden Degeneration der RGC,
- Markierung axotomieresistenter RGC und Analyse aberranter Neubildungen an den Axonen der Nervenfaserschicht,
- Auswertung der axonalen Befunde mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie,
- Anfertigung von grafischen Rekonstruktionen und einer Schnittbildfolge eines ultrastrukturell dargestellten Wachstumskegels.

2 Literaturübersicht

2.1 Degeneration im ZNS und PNS

Schädigungen des ZNS und PNS führen zu Veränderungen der Nervenzellen auf strukturell-morphologischer und molekularbiologisch-funktioneller Ebene.

Das Gehirn und das Rückenmark von Säugetieren und Vögeln sind nicht in der Lage, nach Verletzung zu regenerieren (RAMON Y CAJAL 1928; WINDLE 1956).

Das PNS hingegen verfügt über Regenerationsfähigkeiten, mit denen eine Wiederetablierung der jeweils spezifischen Strukturen möglich ist (RAMON Y CAJAL 1914; GUTH 1956; CARBONETTO et al. 1987). Funktionelle Verbindungen mit den entsprechenden Zielorganen (z.B. Muskel) können wiederhergestellt werden (IDE et al. 1983; KEYNES et al. 1984).

Die Trennung eines Neuriten von seinem zugehörigen Zellkörper führt zu einer absteigenden Degeneration des distalen Axonendes, gefolgt von Umgestaltungen des Perikaryons mit seinen Fortsätzen (CRAGG 1970; LIEBERMANN 1971; KREUTZBERG 1982; ANDERSON et al. 1982) und der perineuronalen zellulären Umgebung (BARRON et al. 1971; LIEBERMANN 1971; GRAFSTEIN und McQUARRIE 1978). Die Degeneration und die Nekrose der vom Zellkörper isolierten Faser werden sowohl im ZNS als auch im PNS unter dem Begriff WALLER- oder sekundäre Degeneration zusammengefasst. Es kommt unter Auflösung des Achsenzyinders und der Myelinscheide zum Untergang der kompletten Nervenfasern (OORSCHOT und JONES 1990). Im ZNS vollzieht sich ein verzögerter Abbauprozess dieser funktionslosen neuronalen Strukturen durch monozytäre Phagozyten (PERRY et al. 1987; PERRY und BROWN 1992).

Eine Unterbrechung der axonalen Kontinuität führt zu einer Reihe morphologischer, metabolischer und elektrophysiologischer Veränderungen im Nervenzellkörper (retrograde Degeneration, KREUTZBERG 1982).

1892 durchtrennte NISSL (1892) die Axone des siebten Hirnnervs, *Nervus intermedio facialis*, beim Kaninchen und beschrieb die Reaktionen im Fazialiskern. Zur lichtmikroskopischen Darstellung nutzte er eine Lösung aus basischen Anilinfarbstoffen. Der basische Anilinring reagiert mit den sauren Komponenten der Zelle, d.h. der RNA des Nucleolus und des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER; KOLIATSOS und PRICE 1996). Nach einer Durchtrennung des Axons unterliegt das rER dem Zerfall und der Auflösung seines Gefüges (Chromatolyse). Man versteht heute unter dem Begriff nicht nur die Auflösung der Nissl-Körperchen, sondern auch die

Verlagerung des Nucleus vom Zentrum in die Peripherie und die Größenzunahme des Somas nach Axotomie (KREUTZBERG 1982).

Welche Mechanismen lösen eine Chromatolyse nach Axotomie aus? Welche Faktoren sind für das erste Auftreten und die Regelung der perikaryalen Reaktionen verantwortlich?

CRAGG (1970) stellte eine Serie von Hypothesen der Signalmechanismen auf. Eine der Hypothesen besagt, dass vom intakten Neuron eine Unterdrückersubstanz in Form eines Proteins gebildet wird. Dieses Protein kann die RNA-Synthese der Zelle unterdrücken. Nach axonaler Schädigung kommt es zu einem Mangel des Proteins. Es erfolgt ein Anstieg der RNA-Synthese. Der schnelle Beginn der RNA-Synthese bei weit proximal gelegenen Läsionen könnte eine Erklärung für die Chromatolyse sein (LIEBERMANN 1971).

CRAGG (1970) vermutete, dass auch der Verlust eines trophischen Faktors, der von peripheren Erfolgsorganen gebildet wird, auf retrogradem Weg ein informatives Signal darstellen könnte. FORMAN (1983), der sich mit Fragen des anterograden und retrograden Transports in Axonen auseinandersetzte, bestätigte diese These. BISBY und BULGER (1977) und BULGER und BISBY (1978) fanden eine Beteiligung der von der Nervenzelle selbst gebildeten Produkte. In diesem Fall nimmt die Zelle als informatives Signal die Akkumulation der neu synthetisierten Produkte an der proximalen Läsionsstelle und den verfrühten Rückzug der unveränderten Produkte zur Zelle via retrogradem Transport wahr.

In enger Assoziation mit der Hypothese des peripher gebildeten trophischen Faktors steht das NTF-Konzept (*neurotrophic factor concept*; KORSCHING 1993). Dieses Konzept basiert auf der Vermutung, dass die Zielzellen einer Population von Projektionsneuronen einen Faktor synthetisieren, von dessen Aufnahme und retrogradem Transport das Überleben der innervierenden Nervenzellen abhängt. Der plötzliche Abbruch einer für die Versorgung und den Erhalt der Lebensfähigkeit der Nervenzelle essentiellen Substanz kann sie in eine veränderte Stoffwechselsituation überführen, wobei deren endgültiges Schicksal von mehreren Faktoren abhängt. Somit ist das Ausmaß der chromatolytischen Veränderungen abhängig von der Stärke und Einwirkungsdauer der schädigenden Noxe, von der Lokalisation (ZNS/PNS), vom axotomierten Neuronentyp, vom Läsionsort in Beziehung zum Zellkörper (proximal/distal) und nicht zuletzt von der Tierart und dem Alter des Tieres (KREUTZBERG 1982).

Die Dendriten als eine indirekt beeinflusste Komponente axotomierter Neurone sind ein sensibler Indikator für retrograde Degeneration (THANOS 1988a). Es können an ihnen eine Verringerung der dendritischen Verzweigung und des dendritischen Transports sowie veränderte Membraneigenschaften als Ausdruck pathologischer Verhältnisse festgestellt werden (ANDERSON et al. 1982).

Am Soma und an den proximalen Dendriten kommt es zu einem Verlust der Synapsen. Drei bis fünf Tage nach der Axotomie sind bevorzugt proliferative Mikroglia zu beobachten, die mit ihren langen Fortsätzen zwischen den synaptischen Anteilen vordringen. Der Vorgang des *synaptic stripping* wird einerseits durch die physikalische Barriere der Mikroglia, andererseits durch Einfluss auf die Transmitterfreisetzung (chemische Barriere) ausgelöst (BLINZINGER und KREUTZBERG 1968). Die Veränderungen haben einen unmittelbaren Einfluss auf das NTF-Konzept, das neben dem schon beschriebenen retrograden Mechanismus auch über einen anterograden Mechanismus verfügt (KORSCHING 1993).

Nicht nur die Neurone, sondern auch ihre gliale Umgebung sind strukturellen und funktionellen Modifikationen unterworfen.

Das charakteristischste Merkmal der Mikrogliazellen (MGZ) ist ihre schnelle Aktivierung nach pathologischen Ereignissen im ZNS. Die Stimulation der MGZ als protagonistischer Schritt fungiert als Schutz des neuronalen Parenchyms gegen infektiöse Erkrankungen, Entzündungen, Traumen, Ischämien und Neurodegenerationen (KREUTZBERG 1996). Die MGZ sind eine polymorphe mobile, dabei sehr reaktive Zellgruppe (GEHRMANN 1996; KETTENMANN und RANSOM 1995) und gehören zum körpereigenen Abwehrsystem. Sie stammen aus dem hämatopoetischen System. Mit Beginn des natürlich vorkommenden Zelltodes gelangen sie in das Gehirn (MOORE und THANOS 1996). Durch Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktor $\beta 1$ (TNF- $\beta 1$) und verschiedene Mitogene wird die Signalwirkung zur MGZ-Aktivierung ausgelöst (KREUTZBERG 1996). Die Hauptaufgabe besteht in der Phagozytose von funktionslosem Zelldetritus (BARRON 1989; THANOS 1991), weshalb den MGZ auch die Bezeichnung *scavenger cells* (Aasfresserzellen) gegeben wurde. Eine Unterstützung ihrer phagozytotischen Funktion erfahren sie von den hämatogenen Makrophagen (MP), die ca. 48 Stunden nach einer Verletzung über das Blut am Ort der Läsion eintreffen (GUILIAN et al. 1989).

Die transformierten, potentiell zytotoxischen MGZ übernehmen auch Aufgaben im Sinne der Gewebereparatur und neuronalen Regeneration. Sie bilden ein Netzwerk von immunkompetenten residenten MP, die zur Immunitätsüberwachung und -kontrolle fähig sind. Die aktivierten MGZ beseitigen eingedrungene Mikroorganismen, entfernen zugrundegegangenen Zelldebris, fördern die Gewebereparatur durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und erleichtern so die Wiederherstellung der Gewebemöostase (KREUTZBERG 1996).

Im adulten Gehirn sind die bekanntesten Charakteristika von Astrozyten nach einer Läsion die Hypertrophie und Hyperplasie, die zu einer ausgedehnten gliotischen Narbenbildung führen (REIER et al. 1983). Im Gegensatz dazu kommt es nach einer Verletzung im juvenilen Gehirn zur Bildung einer milden Gliose durch Astrozyten (BARRETT et al. 1984; BERNSTEIN et al. 1981). Sie sind an der Phagozytose beteiligt (AL-ALI et al. 1988) und besitzen auch wachstumsfördernde Eigenschaften im geschädigten juvenilen Gehirn (SILVER et al. 1982; SMITH et al. 1986). Eine

andere axotomieinduzierte Begleiterscheinung dieser Neuroglia ist eine gesteigerte Expression von *glial fibrillary acid protein* (COOK und WISNIEWSKI 1973; GRAEBER und KREUTZBERG 1988).

Der nach einer Verletzung im Bereich des Axons einer peripheren Nervenzelle entstandene Zell- und Myelindebris wird von ortsansässigen SCHWANN-Zellen (PELLEGRINO und SPENCER 1985, PELLEGRINO et al. 1986; AZZARELLI et al. 1993), hämatogenen MP (STOLL et al. 1989; PERRY und BROWN 1992), aus dem Bindegewebe eingewanderten Fibroblasten und Mastzellen (BEUCHE und FRIEDE 1984) sowie eosinophilen Granulozyten phagozytiert. PERRY und BROWN (1992) beschrieben eine erhebliche Bedeutung der MP im Degenerationsprozess des PNS:

- Beseitigung des Zell- und Myelindebris durch Phagozytose,
- Sekretion von Apolipoprotein E, das die axonale Elongation (IGNATIUS et al. 1987) und die nachfolgende Remyelinisierung (BOYLES et al. 1990) unterstützt,
- Sekretion von Faktoren, die die Teilung der SCHWANN-Zellen induzieren (BAICHWAL et al. 1988) und
- Freisetzung von Interleukin-1 (IL-1), das SCHWANN-Zellen und Fibroblasten zur Expression von *nerve growth factor* (NGF) stimuliert (LINDHOLM et al. 1987; ROTSHENKER et al. 1992).

Besondere Bedeutung im PNS erlangen die SCHWANN-Zellen und die hämatogenen Makrophagen. Sie besitzen morphologische und funktionelle Eigenschaften, die es ihnen erlauben, sowohl im Degenerations- als auch im Regenerationsprozess zu wirken. Sie verkörpern das Substrat für Effektivität und Leistungsfähigkeit des PNS.

2.2 Regeneration im ZNS und PNS

2.2.1 Der Wachstumskegel - eine an die Regeneration gebundene Struktur

Die Regeneration des Nervensystems geht vom proximalen Stumpf der durchtrennten Nervenfasern aus (RAMON Y CAJAL 1928; PELLEGRINO und SPENCER 1985). Für eine erfolgreiche Regeneration ist die morphologische Umgestaltung des Neuriten unumgänglich. Nach einer axonalen Durchtrennung kommt es in vielen Fällen zu einer Umformung des geschädigten Axons in einen Wachstumskegel (SHAW und BRAY 1977; BAAS und HEIDEMANN 1986; ASHERY et al. 1996). Der Wachstumskegel, ein aus Zytoskelettproteinen zusammengesetzter Apparat, fungiert als ein richtungsweisender Sensor, der gleichzeitig den Ort des Membraneinfügens zur Verlängerung des Axons darstellt (LETOURNEAU et al. 1992). Die Umdifferenzierung des stabilen

zylindrischen axonalen Segments in einen motilen irregulär geformten Wachstumskegel ist eine wichtige Maßnahme im Regenerationsprozess geschädigter Axone. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die detaillierten Transformationsmechanismen noch relativ unbekannt (ZIV und SPIRA 1997).

Wachstumskegel sind hochspezialisierte, vielseitige, dynamische Strukturen, denen eine potentielle Bedeutung während des Axonwachstums in der Embryonalperiode und bei der Axonregeneration zukommt. Durch ihre Existenz wird das Aufsuchen und Auffinden der entsprechenden Zielstruktur sowie die Ausbildung von synaptischen Kontakten ermöglicht.

Lamellipodiale und filopodiale Strukturen des Wachstumskegels sind Voraussetzungen für ihre Beweglichkeit (STUERMER 1992). Mit Hilfe dieser morphologischen Organisation nehmen sie ihre unmittelbare Umgebung, die Extrazellulärmatrix (*extracellular matrix*, ECM) wahr, um durch einen hohen Grad an Selektivität beim Erkennen von Leitmolekülen ihre exakte Richtung zu detektieren. Bedeutende Leitmoleküle oder Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecule*, CAM) sind Laminin, Fibronectin, A-CAM und L1.

Die sensorischen und motilen Funktionen basieren auf der Fähigkeit des Wachstumskegels, extrazelluläre Signale in Veränderungen der zytoskelettalen Organisation und Funktion umzuformen (CYPHER und LETOURNEAU 1991). Eine detaillierte Vorstellung darüber, wie einzelne Moleküle eine Änderung der Wachstumsrichtung des Wachstumskegels bewirken, existiert zur Zeit noch nicht.

Die Gradiententheorie nach GIERER (1987) diente dazu, ein realistisches Konzept zu entwerfen, das beschreibt, wie die molekulare Ausstattung der Axone und die ihrer Umgebung unter Verwendung biologischer Regeln aussehen könnte (Abb. 1).

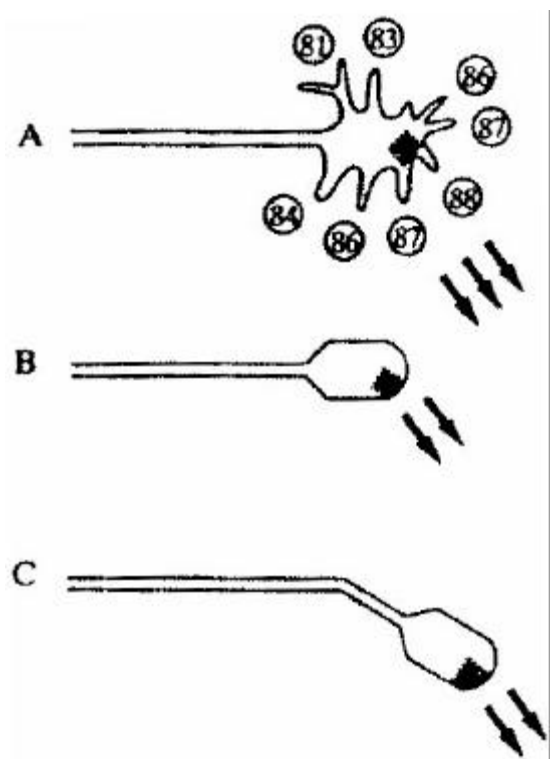


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Wachstumskegels (nach GIERER 1987). Ein Wachstumskegel misst über seine Filopodien verschiedene Konzentrationen von Molekülen in der ECM und verrechnet sie intrinsisch (A). Das Filopodium mit dem Wert, der seinem „Sollwert“ (Rezeptorausstattung) am ähnlichsten ist, wird stabilisiert und aktiviert (B) und der Wachstumskegel wächst in diese Richtung. Durch seine Fähigkeit der intrinsischen Verrechnung kann er zwischen „attraktiv“ und „repulsiv“ wirkenden Kräften unterscheiden. Hat er seine korrekte Richtung detektiert, rundet er sich ab und bewegt sich zügig voran (C).

Modelle gehen davon aus, dass die Rezeptoren des Wachstumskegels Moleküle binden, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die über Second-Messenger-Systeme vermittelt wird. In der Folge könnte es im Wachstumskegel zu einer lokalen Konzentrationsänderung von Ionen (z.B. Kalzium) und einer lokalen Aktivierung von Enzymen kommen, die über eine Umorganisation des Zytoskeletts eine nachfolgende Wachstumsrichtung veranlassen.

Der Protagonist der Signalübertragung ist ein innerhalb der Lipidproteindoppelschicht des Wachstumskegels gelegenes Transmembranprotein, das einen adhäsiven Zell-Zell-Kontakt mit Leitmolekülen der ECM bewirkt. Es handelt sich um das Glykoprotein Integrin. Die Integrine sind an den stark beweglichen Filopodien lokalisiert. Die Filopodien agieren abwechselnd in einer protrusiven und repulsiven Aktion. Man unterscheidet demnach zwischen attraktiv und repulsiv wirkenden Umgebungssignalen (BAIER und BONHOEFFER 1994). Es ist zu beachten, dass attraktiv und repulsiv keine Eigenschaften spezifischer Signalmoleküle sind, sondern eine phänomenologische Beschreibung der Effekte einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung auf den Wachstumskegel wiedergeben. Demnach kann ein und derselbe Ligand sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken (GOODMAN 1994). Nimmt der Wachstumskegel einen adhäsiven Zell-Zell-Kontakt an einem Filopodium wahr, dann ändert er seine Gestalt. Aus dem ruhenden, suchenden, passiven mit ausgeprägten Filopodien besetzten Wachstumskegel (komplexer Wachstumskegel, Abb. 1 A) entsteht ein sich schnell bewegend, aktiver, voranschreitender Wachstumskegel mit einer abgerundeten Kontur (einfacher Wachstumskegel, Abb. 1 B und Abb. 1 C). Das Axon verlängert sich mit hoher Geschwindigkeit.

In dem Maße, wie sich der Wachstumskegel und das Axon verlängern, kommt es zur Vergrößerung der axonalen Membran. Die vom Zellkörper neu synthetisierten Membranbausteine, Lipide und Proteine (GRIFFIN et al. 1981; PFENNIGER und JOHNSON 1983), werden in Transportvesikeln verpackt und entlang von Mikrotubuli zum Ort des Verbrauchs befördert (JESSELL 1996, S. 106). Im Wachstumskegel angelangt, fusionieren die Membranbausteine mit wachstumskegelspezifischen Vesikeln (*growth cone vesicles*, GCV) (BUNGE 1973; PFENNIGER et al. 1992; PFENNIGER und FRIEDMAN 1993). Anschließend werden die Membranbausteine durch Exozytose in das Axolemm eingefügt (OSEN-SAND et al. 1993; FUTERMAN und BANKER 1996). Dieser Vorgang wurde als *plasmalemmal expansion* definiert (PFENNIGER und MAYLIÉ-PFENNIGER 1981).

2.2.2 Regeneration im PNS

Das PNS ist in zweierlei Hinsicht für Regenerationen prädestiniert. Es verfügt über eine große Population an Abräumzellen zur unverzüglichen Beseitigung von degeneriertem Material und es enthält ein zelluläres Begleitgefüge, das komplette Regenerationen ermöglicht. Auch im PNS sind Zellsterben und Apoptose unvermeidliche Reaktionen starker Schädigungen. Jedoch ist das PNS

mit einem intrinsischen und extrinsischen Milieu ausgestattet, beide erlauben qualitativ und quantitativ hochwertige Regenerationen im Sinne einer *Restitutio ad integrum* (HALL 1989). Die Regeneration im PNS ist auf die wechselseitige Interaktion zwischen dem Wachstumskegel, SCHWANN-Zellen, MP und Fibroblasten angewiesen. Schlüsselschritt der funktionellen Wiederherstellung ist die Proliferation und Migration von SCHWANN-Zellen in das verbleibende Bindegewebe (SPEIDEL 1964; SUNDERLAND 1968; DUBOIS-DALCQ et al. 1981). Die von hämatogenen MP gebildeten und freigesetzten Mitogene stimulieren die Proliferation der SCHWANN-Zellen (BAICHWAL 1988). Auch die Axone selbst können ein mitogenes Oberflächenprotein synthetisieren (SALZER et al. 1980), wie *in vitro*-Studien gezeigt haben (WOOD und BUNGE 1975). Die Gliazellen des PNS proliferieren vom proximalen und distalen Ende der durchtrennten Nervenfasern und bilden in Säulen angeordnete Zellstränge *bands of Bünger* (AGUAYO et al. 1981; WANG et al. 1992a). Die Zellstränge dienen dem Wachstumskegel des geschädigten Neuriten als Art Leitschiene. An der inneren Oberfläche der SCHWANN-Zellen existieren zwei Substanzen, die zu den Zelladhäsionsmolekülen der ECM des PNS zählen und von den peripheren Gliazellen selbst gebildet werden (RAMON Y CAJAL 1968; SUNDERLAND 1978). Dem Laminin, das an der zellulären Seite der Basallamina von SCHWANN-Zellen lokalisiert ist (HARVEY und PLANT 1995; BATES und MEYER 1997), und dem Fibronectin an der interstitiellen Seite der Basalmembran (TOHYAMA und IDE 1984) werden regenerationsfördernde Eigenschaften zuerkannt. Laminin übernimmt wichtige Aufgaben bei der Unterstützung der Axonelongation (TOHYAMA und IDE 1984; WANG et al. 1992b). EVERCOOREN et al. (1982) konnten bei *in vitro*-Versuchen eine Wachstums- und Motilitätssteigerung der peripheren Gliazellen in Gegenwart von Fibronectin nachweisen. Im PNS ist daher eine nahezu vollständige Wiederherstellung der Nervenfasernstrukturen möglich (CRAGG und THOMAS 1964; DIAMOND und JACKSON 1980).

2.2.3 Regenerationskapazitäten im ZNS

Die fehlende Regenerationsfähigkeit zentraler Neurone bei Säugern und Vögeln unterscheidet sich nicht nur vom Regenerationsverhalten des PNS. Sie unterscheidet sich auch explizit von der Regenerationsfähigkeit des ZNS bei Fischen und Amphibien. So ist das ZNS dieser Tierarten in der Lage, verletzte zentrale Fasertrakte funktionell zu regenerieren (OORSCHOT und JONES 1990).

Die Ergebnisse basieren unter anderem auf Versuchen, in denen experimentell das Rückenmark (HOOKER 1932; KIRSCHKE 1951) und der Sehnerv (SPERRY 1955; CLEMENTE 1964) von Fischen durchtrennt wurden.

Die funktionelle Regeneration des Sehnervs von Fischen umfasst (CLEMENTE 1964; SCHMIDT und EDWARDS 1983; STUERMER und EASTER 1984):

- Überleben des Perikaryons der geschädigten Nervenfasern,
- Ausbildung eines Wachstumskegels am durchtrennten Axon für Elongations- und Wachstumsvorgänge,
- Auffinden der Zielstruktur *Tectum* und
- Bildung echter synaptischer Kontakte mit topographisch exakten Projektionsneuronen im *Tectum*.

Die Reptilien nehmen zwischen dem regenerationsaktiven ZNS der Anamnioten und dem regenerationspassiven ZNS der Amnioten, zu denen sie selbst zählen, eine Zwischenstellung ein. So konnte bei Eidechsen die Regeneration des Rückenmarks beobachtet werden, nachdem der Schwanz amputiert wurde. Die langen Projektionsbahnen aus dem Gehirn zeigten erkennbares Wachstum (DUFFY et al. 1990).

Das Resümee der Forschungsergebnisse basiert weiterhin auf der Feststellung, dass die Fähigkeit zur Regeneration bei solchen Tierarten ausgeprägt ist, die während ihres gesamten Lebens wachsen (Fische, Amphibien). Besonders erkennbar ist dies beim Goldfisch, bei dem parallel zum Körperwachstum auch das Nervensystem eine deutliche Vergrößerung erfährt. Die Vergrößerung der Retina und des *Tectums* vollzieht sich durch Zellteilungen, die in der Retina am peripheren Rand und im *Tectum* in einer halbmondförmigen Zone im kaudalen Bereich lokalisiert sind (JOHNS 1977; RAYMOND und EASTER 1983). Mit dem Zuwachs neuer Ganglienzellen entstehen fortlaufend neue Ganglienzellaxone, die über den *Nervus opticus* ins *Tectum* einwachsen. In der Retina erwachsener Fische ist somit ständig eine kleine Gruppe wachsender Axone zu finden, die sich in einem embryonalen Status befinden (EASTER et al. 1981). So vollziehen sich Prozesse, wie Proliferation von Nervenzellen, axonales Wachstum und Synaptogenese. Aufgrund dieser Beobachtung formulierten HOLDER und CLARKE (1988) die Hypothese, dass eine Korrelation zwischen Neurogenese und Regenerationsfähigkeit besteht.

Auch das PNS von adulten Säugetieren und Vögeln hält zeitlebens eine beträchtliche Regenerationsfähigkeit aufrecht, obwohl dort keine Neurogenese mehr vorkommt. Eine Korrelation zwischen Neurogenese und der Fähigkeit zur *Restitutio ad integrum* hat demnach nur insofern Gültigkeit, dass sie für proliferierende Neuronenpopulationen gilt.

Diese Feststellung könnte die Regenerationskapazität des juvenilen, in der Proliferation befindlichen ZNS bei Säugern erklären. Unilaterale Schädigungen des kortikospinalen Traktes bei vier bis acht Tage alten Hamstern führten zu einem Wiederauswachsen der durchtrennten Axone (KALIL und REH 1982) und zur Synaptogenese. Die Feinmotorik der geschädigten Vordergliedmaße konnte wiederhergestellt werden. In Hamstern, die nach dem 21. postnatalen Tag operiert wurden, war die Funktion der Vordergliedmaße stark eingeschränkt. Dieser auch als

kritische Periode bekannte Zeitabschnitt repräsentiert den Übergang in das Unvermögen zur funktionellen Regeneration im adulten Säuger-ZNS (SMITH et al. 1986).

Hohe regenerative Potenzen im ausgereiften Säuger-ZNS zeigen hingegen die *Fila olfactoria* des Riechsystems (BARBER 1981; RAISMAN 1985) und das monoaminerge System nach mechanischen und chemischen Axotomien (NYGREN et al. 1971). Eine interessante Interpretation des Befundes am monoaminergen System lieferten SVENDEGAARD et al. (1976), indem sie die cholinergen und monoaminergen Neurone zur *Formatio reticularis*, einem phylogenetisch alten Gehirnteil, zuordneten. In der *Formatio reticularis* sind Neuronenklassen lokalisiert, denen ein hoher Grad an morphologischer Plastizität im adulten Organismus zugeschrieben werden kann.

Vergleichende Analysen der axonalen Regeneration im ZNS und PNS der Säuger sowie in niederen Wirbeltieren führten zur Aufstellung zahlreicher Hypothesen (Abb. 2), die versuchen, die begrenzte funktionelle Regenerationskapazität zentraler Neurone zu erklären (OORSCHOT und JONES 1990).

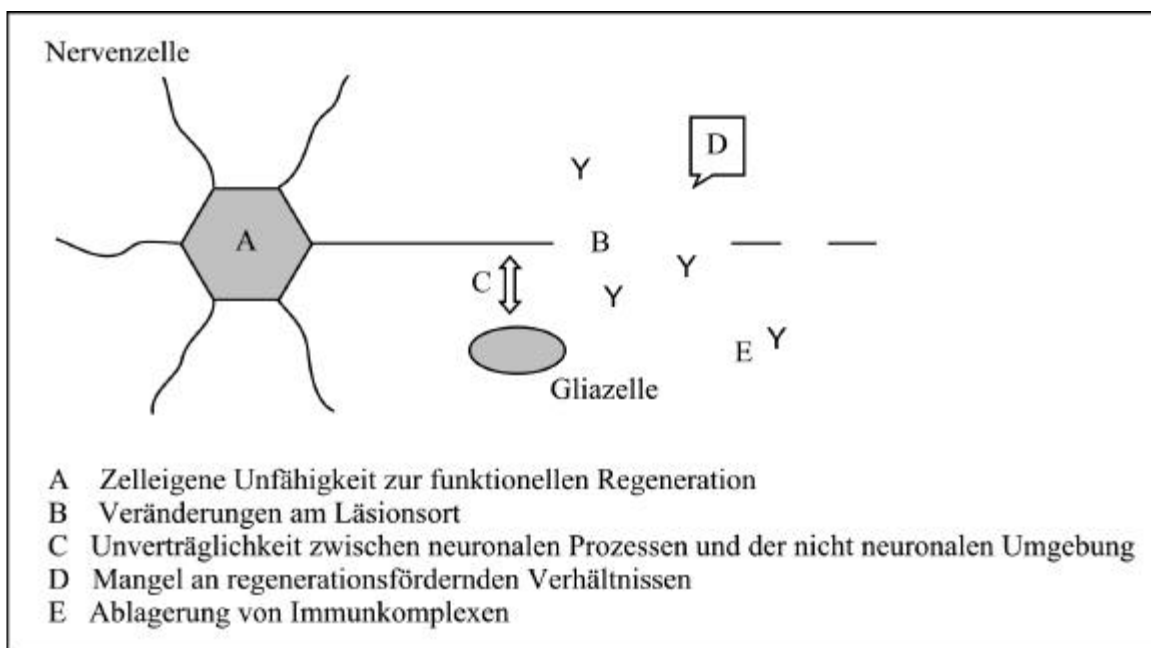


Abb. 2: Schematische Darstellung der Hypothesen zur Erklärung der Regenerationsunfähigkeit im ZNS (modifiziert nach OORSCHOT und JONES 1990)

Zelleigene Unfähigkeit zur funktionellen Regeneration

Die intrinsische Unfähigkeit von Neuronen des ZNS auf eine Verletzung mit funktioneller Regeneration zu reagieren, wurde schon frühzeitig als ursächlicher Faktor erkannt und beschrieben. Die Befunde von LE GROS CLARK (1942, 1943) ergaben keinen Nachweis für eine Penetration zentraler Axone in ein peripheres Nerven-Transplantat. Moderne adäquate experimentelle

Versuchsbedingungen zeigen jedoch große Regenerationskapazitäten (u.a. DAVID und AGUAYO 1981, 1985; VILLEGAS-PEREZ et al. 1988a). Deshalb kann man vermuten, dass diese Versuche unter sehr einfacher experimenteller Ausstattung durchgeführt wurden und keine den aktuellen Forschungsbedingungen adäquaten Befunde ermöglichten. Die Unfähigkeit zur kontinuierlichen Neurogenese (HOLDER und CLARKE 1988) und der Nachweis insuffizienter Reaktionen zentraler Neurone sind unentbehrliche Kriterien für die Einschätzung des Regenerationsunvermögens des ZNS.

Das Ziel dieser Dissertation war es, nach Axotomie des Sehnervs das Ausmaß intrinsischer Kompetenzen an den Ganglienzellaxonen adulter Ratten zu analysieren.

Veränderungen am Läsionsort

Die durch die Schädigung am Läsionsort gebildeten nekrotischen Veränderungen und zystischen Kavitäten werden als mögliche Ursachen für ein fehlendes Auswachsen der Axone genannt (KAO et al. 1977; GUTH et al. 1981, 1983). Auch die Bildung einer Gliaarbe durch Hypertrophie und Hyperplasie von Astrozyten (COOK und WÍSNIIEWSKI 1973; GRAEBER und KREUTZBERG 1988), Fibroblasten (WINDLE 1956) und Endothelzellen (CAVANAGH 1970) wirkt als physikalische und/oder chemische Barriere (CHAMBERS 1955; WINDLE 1956) dem Axonwachstum entgegen. Dieses Konzept basiert darauf, dass die durchtrennten Axone in einer Gliaarbe enden. Eine inhibitorische Wirkung wird den während der Degeneration freigesetzten Myelinabbauprodukten beigemessen (BERRY 1982). Die Anwesenheit von Myelin scheint eine besondere Bedeutung im Prozess der Regenerationsunfähigkeit zu haben.

Unverträglichkeit zwischen neuronalen Prozessen und der nichtneuronalen Umgebung

Neben der Fähigkeit zur Phagozytose sezernieren aktivierte MGZ zytotoxische Substanzen wie Proteasen, Arachidonsäurederivate und verschiedene Zytokine (KREUTZBERG 1996). Besonders der freigesetzte Tumor-Nekrose-Faktor- α hemmt die Myelinisierung von Nervenfasern. MGZ besitzen keine potentiell hemmende Wirkung auf axonale Regeneration (KREUTZBERG 1996).

Hinsichtlich der Bedeutung von Astrozyten in Regenerationprozessen bestehen konträre Auffassungen. Die Astrozyten unterliegen in ihrer Wirkung auf neuronale Strukturen der kritischen Periode (SMITH et al. 1986). Jungen Astrozyten wird ein permissiver Effekt zugeschrieben (HALL et al. 1992), wobei beim Überschreiten des achten postnatalen Tages die wachstumsfördernden Eigenschaften durch Proliferation verloren gehen (REIER 1986; BAEHR et al. 1995).

Die Oligodendrozyten und das von ihnen produzierte Myelin haben ebenfalls einen inhibitorischen Einfluss auf die axonale Elongation (SCHWAB und CARONI 1988). Die Ursache

sind zwei Proteine, die Neuriten-Wachstumshemmer NI-35 und NI-250, die als Membranproteine im ZNS-Myelin vorkommen (SCHWAB 1990).

Mangel an regenerationsfördernden Verhältnissen

Axonales Wachstum orientiert sich in erster Linie an der Existenz einer Art Leitschiene, an der die Axone zielgerichtet wachsen können. Die 1981 von AGUAYO et al. beschriebenen *bands of Bünger* der SCHWANN-Zellen fungieren als Wegweiser im axonalen Elongationsprozess.

Der Verlust von geeigneten ECM-Molekülen limitiert das Regenerationsvermögen des adulten ZNS. Das im embryonalen Gehirn der Ratte von Gliazellen produzierte Laminin fehlt mit zunehmendem Alter. Jedoch bleibt die Fähigkeit von adulten ZNS-Neuronen *in vitro* auf Laminin zu reagieren, in hohem Maße erhalten (FORD-HOLEVINSKI et al. 1986).

Der bekannteste Wachstumsfaktor ist der NGF, der einen bemerkenswerten Effekt (LEVI-MONTALCINI 1987) auf die Entwicklung und Regeneration sympathischer und sensorischer Neurone ausübt. Zahlreiche Arbeitsgruppen untersuchten die Bedeutung von NGF für die Regeneration zentraler Neurone (KIERNAN 1978; LUND 1978; VARON und BUNGE 1978; BERRY 1979).

Überschießende Immunreaktionen

Die durch eine Schädigung aktivierte humorale und zelluläre Abwehr führt zur Bildung von Immunkomplexen. Die Immunkomplexe behindern eine erfolgreiche Regeneration durch Verdecken des molekularen Leitweges der wachsenden Axone (FERINGA et al. 1973). Da im PNS sehr zeitig eine Phagozytose mit nachfolgender Denaturierung der Antigene stattfindet, ist das Auftreten von Immunkomplexen dort irrelevant (BERRY und RICHES 1974).

Retrospektiv lässt sich zusammenfassen:

- Während der Entwicklung verlieren ZNS-Neurone ihre intrinsische Fähigkeit, nach Axotomie zu regenerieren.
- Im ZNS unterdrücken inhibitorische Mechanismen die Wachstumsantwort verletzter Neurone.
- Im Unterschied zum PNS fehlen im ZNS die für die Axone notwendigen wachstumsfördernden Substanzen.

2.2.4 Einflussmöglichkeiten auf die ZNS-Regeneration

Die Optimierung des Regenerationsverhaltens zentraler Nervenzellen konzentriert sich auf experimentelle Strategien (SO und YIP 1998), in denen versucht wird, durch steuernde Eingriffe die Überlebensfähigkeit verletzter Neurone zu steigern. Diese auch als Neuroprotektion bezeichneten Strategien lassen sich in drei grundlegende Punkte untergliedern:

- Neutralisation der zentralen inhibitorischen Gliazellen,
- Ersetzen der zentralen inhibitorischen Gliazellen durch permissive periphere Gliazellen und
- Applikation regenerationsfördernder Substanzen.

Neutralisation der zentralen inhibitorischen Gliazellen

Der lokal hemmende Einfluss der Oligodendrozyten und des Myelins auf die axonale Elongation wurde 1988 von SCHWAB und CARONI umfassend dokumentiert. Die beiden neuritenwachstumshemmenden Proteine NI-35 und NI-250 des ZNS-Myelins höherer Vertebraten konnten durch die Verwendung des spezifischen monoklonalen Antikörpers *inhibiting neutralizing antibody* (IN-1) in in vitro-Versuchen neutralisiert werden. So zeigten die Axone des NO bei der Ratte Elongationsleistungen, die unmittelbar auf diese Neutralisation zurückgeführt werden konnten (WEIBEL et al. 1994). BREGMAN et al. (1995) konnten eine Wiederherstellung funktioneller Defizite nach Rückenmarkverletzungen erfassen.

Die Überlebensfähigkeit geschädigter retinaler Ganglienzellen ließ sich durch Injektion von *macrophage/microglia inhibiting factor* (MIF) in den Glaskörper nach Axotomie des Sehnervs erhöhen (THANOS et al. 1993).

Ersetzen der zentralen inhibitorischen Gliazellen durch permissive periphere Gliazellen

Die Transplantation peripherer Nerven in das ZNS-Gewebe dient den axotomierten Neuronen als wachstumspermissive Brücke. Der Leitgedanke dieser experimentellen Ansätze basiert auf der Grundlage der enormen Regenerationsfähigkeit des PNS durch die Existenz des neurotrophischen Milieus. Ziel ist es, die regenerationshemmende zentrale Glia durch die peripheren SCHWANN-Zellen mit ihren wachstumsfördernden Komponenten zu ersetzen (ASSOULINE et al. 1987).

Mit diesem Ansatz gelang es, im Rückenmark (DAVID und AGUAYO 1981, 1985; AGUAYO et al. 1983, 1984) eine funktionelle Regeneration zu erreichen. Insbesondere im visuellen System der Ratte wurden Axonregeneration (SO und AGUAYO 1985; POLITIS und SPENCER 1986; BERRY et al. 1986; VILLEGAS-PEREZ et al. 1988a), Synaptogenese (VIDAL-SANZ et al. 1987),

elektrophysiologisch ermittelte Regeneration (KEIRSTEAD et al. 1985) und strukturell funktionelle Regeneration (THANOS et al. 1992) nachgewiesen.

CHO und SO (1992) erkannten nach Implantationsversuchen beim adulten Goldhamster ein Regenerationsvermögen der RGC durch Wachsen von *axon-like processes*. Sie entnahmen ein ca. 1,5 bis 2 mm großes Stück des *Nervus peroneus* und implantierten es nach Quetschung des Sehnervs in den Glaskörper des Auges.

Applikation regenerationsfördernder Substanzen

SCHWANN-Zellen-Kulturen aus der Brachialregion der Ratte, gewachsen auf einem Nitrozellulosefilter, wurden in das visuelle System verbracht und waren für einen großen Wachstumseffekt der RGC verantwortlich (CHEN et al. 1991).

Ihr Effekt auf das Überleben und das axonale Wachstum von RGC konnte *in vitro* (ARD et al. 1987; BAEHR und BUNGE 1989) und *in vivo* (BERRY et al. 1988; DEZAWA und ADACHI-USAMI 2000) demonstriert werden. Der Einfluss der peripheren Glia auf elongierendes Wachstum von Neuriten ist auf diffusible neurotrophe Faktoren (ASSOULINE et al. 1987), auf oberflächen-gebundene Zellkomponenten und auf die geometrische Zellorganisation (LONGO et al. 1983) zurückzuführen. SCHWANN-Zellen nutzen den Kontakt zum elongierenden Axon über eine Ausbildung von *tight junctions*, die für eine morphologische Stabilisierung zwischen beiden Komponenten verantwortlich sind. Der Substanztausch zwischen beiden wird über die Bildung von *gap junctions* erleichtert (DEZAWA und ADACHI-USAMI 2000).

BERRY et al. (1988) zeigten, dass nur lebende intakte SCHWANN-Zellen zur axonalen Regeneration im ZNS in der Lage sind. Nach Applikation von abgetöteten Gliazellen kommt es zu einer signifikanten Verminderung des axonalen Wachstums oder zum völligen Regenerationsverlust.

Weitere Ergebnisse konnten durch den Einsatz bekannter neurotropher Faktoren erzielt werden, die auch während der regenerativen Phase von den peripheren Gliazellen, MP und Fibroblasten produziert und freigesetzt werden. Ein neurotropher Faktor ist der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). Mit diesem Wachstumsfaktor ließen sich regenerationsunterstützende axonale Wirkungen in unterschiedlichen Gehirnarealen erzielen: Elongation von Axonen im visuellen System (JOHNSON et al. 1986; THANOS und v. BOXBERG 1989; FOURNIER et al. 1997), Verhindern der Atrophie der rubrospinalen Neurone (KOBAYASHI et al. 1997) und spontanes axonales Wachstum im Hippokampus (LOWENSTEIN und ARSENAULT 1996).

2.3 Die Retina und der *Nervus opticus*

Das Rattenauge hat einen Längsdurchmesser von 5,76 mm bis 6,08 mm und einen Querdurchmesser von 5,88 mm bis 6,18 mm (COHRS et al. 1958). Die Linse weist im Äquatorialdurchmesser 2,45 mm und in der Achse 2 mm auf. Sie ist im Verhältnis zum Gesamtbulbus recht groß und wölbt sich weit in den Glaskörperraum hinein.

Die Retina der Albinoratte weist einen Durchmesser von 8 mm, eine Dicke von ca. 208 μm und eine Fläche von 40 mm^2 auf (SCHÖBER und GRUSCHKA 1977).

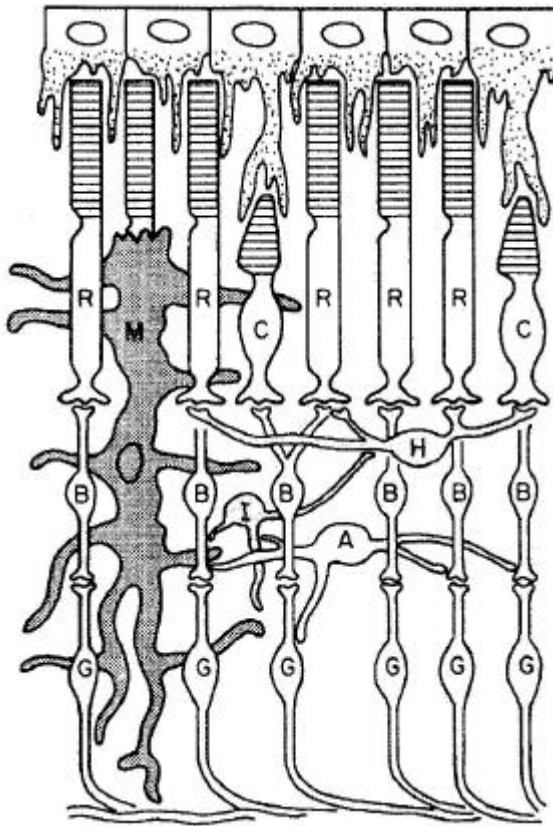
2.3.1 Retina

In der Retina, der lichtempfindlichen inneren Augenhaut, befinden sich die Rezeptoren für die einfallenden Lichtreize. Entwicklungsgeschichtlich ist die Retina einschließlich des *Nervus opticus* ein Teil des Gehirns (KOLB 1989, S. 927). In der Embryonalperiode wächst bilateral eine Augenblase aus dem Zwischenhirn aus. Die Linsenanlage stülpt die Augenblasen von rostral ein und es entsteht ein doppelwandiger Augenbecher, die Retina. Der Stiel des Augenbechers entwickelt sich zum *Nervus opticus*. An der gesamten Retina lassen sich funktionell zwei Anteile differenzieren:

- der lichtempfindliche Sehteil der Netzhaut, *Pars optica retinae*, und
- der lichtunempfindliche, blinde Netzhautanteil, *Pars caeca retinae*,

(BERG 1985, S. 490). Die Retina gliedert sich in zehn Schichten (Abb. 3).

Die Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) wird durch großkernige multipolare Ganglienzellen gebildet. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl der RGC wurde bei zwei Albinoratten 1977 von SCHÖBER und GRUSCHKA mit 108000 bzw. 111000 RGC pro Netzhaut angegeben. Bei Vernachlässigen der präparationsbedingten Peripherieverluste erhöht sich dieser Wert auf 115000 RGC pro Retina. FUKUDA (1977) gibt diesen Wert auch bei pigmentierten Ratten an. Die Zelldichte der RGC schwankt zwischen 1200 / mm^2 in den Randgebieten und 5000 / mm^2 in der *Area centralis*. Dieses Gebiet der höchsten Zelldichte liegt etwa 1,5 bis 2 mm vom *Discus nervi optici* entfernt im oberen temporalen Quadranten (SCHÖBER und GRUSCHKA 1977). Bei pigmentierten Ratten verringert sich diese Distanz vom Discus auf 1 mm (FUKUDA 1977). Der Befund der Zelldichte stimmt mit den Befunden bei pigmentierten Ratten (FUKUDA 1977) und bei der Katze (STONE 1965; HUGHES 1975) überein. Die RGC können nach morphologischen (BROWN 1965; BUNT 1976; SCHÖBER und GRUSCHKA 1977; FUKUDA 1977; PERRY 1979; DREHER et al. 1985; PEICHL 1989), physiologischen (FUKUDA 1971; STONE und FUKUDA 1974; BOYCOTT und WÄSSLE 1974) und synaptischen Kriterien (POLYAK 1957; BOYCOTT und DOWLING 1969) eingeteilt werden.



Pigmentepithelschicht

Stäbchen- und Zapfenschicht

Lamina limitans gliae externa

äußere Körnerschicht

äußere plexiforme Schicht-

innere Körnerschicht

innere plexiforme Schicht-IPL

Ganglienzellschicht-GCL

Nervenfaserschicht-NFL

Lamina limitans gliae interna

Abb. 3: Schematischer Aufbau der Retina (nach ADLER und FARBER 1986); **R:** Stäbchen; **C:** Zapfen; **B:** Bipolarzellen; **H:** Horizontalzellen; **A:** Amakrinzellen; **I:** Interplexiforme Zellen; **G:** Ganglienzellen; **M:** MÜLLER-Zellen

Neben den RGC existiert noch eine weitere Population an Zellen, die verlagerten Amakrinzellen (*displaced amacrine cells*, DAC) in der GCL der Retina (PERRY und WALKER 1980; PERRY 1981), die durch das Fehlen eines Axons charakterisiert ist.

Pränatal und postnatal kommt es in der Ganglienzellschicht der Retina der Katze (WONG und HUGHES 1987), der Ratte (DREHER et al. 1983; CRESPO et al. 1985), des Hamsters (SENGELAUB et al. 1986), des Hühnchens (RAGER und RAGER 1976), des Rhesusaffen (RAKIC und RILEY 1983) und des Menschen (PROVIS et al. 1985) zu physiologischem Zelltod. Während der ersten Tage nach der Geburt reduziert sich die Anzahl der RGC bei der Albinoratte um ca. 35 % (POTTS et al. 1982). Es kommt zu einer Degeneration der RGC, in deren Verlauf pyknotische Fragmente abgelagert werden. Man unterscheidet einen zweiphasigen Zelltod: In der ersten Woche (erste Phase) nach der Geburt sterben vorwiegend RGC; in der zweiten Woche (zweite Phase) degenerieren die DAC (HORSBURGH und SEFTON 1987). Nach Ablauf des Degenerationsprozesses schließt sich die Synaptogenese der IPL an. Sie dient der Aufnahme dauerhafter synaptischer Kontakte mit stabilisierten Zellpartnern. Der natürlich vorkommende

Zelltod spielt durch Eliminierung falsch projizierender Fasern eine entscheidende Rolle bei der Etablierung eines exakten Innervationsmusters im ausgereiften Organismus (COWAN 1973).

2.3.2 *Nervus opticus*

Der *Nervus opticus*, der zweite Hirnnerv, setzt sich aus den Axonen der RGC zusammen. Diese konvergieren zum *Discus nervi optici*, durchbohren die Choroidea und die Sclera (*Foramina laminae cribosae sclerae*), um sich sofort zum NO zu gruppieren (Abb. 4). Mit Austritt aus dem *Bulbus oculi* werden die Axone von der Plasmamembran der Oligodendrozyten myelinisiert. Bis zum Eintritt in den knöchernen Sehkanal ist der NO von einem im Volumen abnehmenden Weichgewebismantel umgeben. Im Moment des Eintretens in den *Canalis nervi optici* reduziert sich die schützende Umhüllung lediglich auf die Hirnhäute und die *A. ophthalmica* (LANG 1981; SLAVIN et al. 1994). Der NO, der einen mittleren Durchmesser von 0,45 mm bei der adulten Ratte aufweist (SCHLOTE 1970), wird vom *M. retractor bulbi* röhrenförmig umgeben.

Der sehr detailliert untersuchte NO besteht neben dem mesodermalen Anteil seiner Hüllen zumindest aus drei unterscheidbaren Zellpopulationen neuroektodermalen Ursprungs, die anhand von Morphologie und Antigenbesatz identifizierbar sind. Dazu zählen die bereits erwähnten Oligodendrozyten (SKOFF et al. 1976a und 1976b) und die Astrozyten vom Typ I und Typ II. Die Typ I-Astrozyten verbinden sich mit Blutgefäßen und der Oberfläche der *Pia mater* des Sehnervs. Die Typ II-Astrozyten scheinen mit den Ranvierschen Schnürringen verbunden zu sein. Die Oligodendrozyten und die Astrozyten vom Typ II stammen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (RAFF et al. 1984).

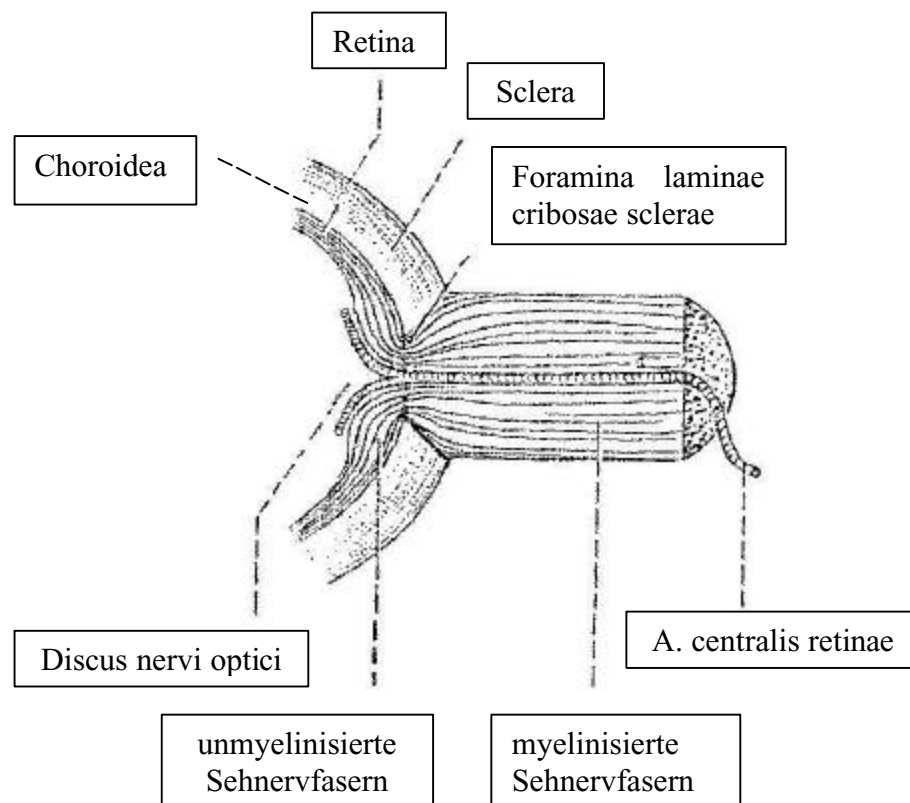


Abb. 4: Longitudinalschnitt des *Nervus opticus* an seinem Austritt aus dem *Bulbus oculi* (modifiziert nach BOSSY 1970)

Die totale Anzahl der Axone im Sehnerv wird für die Albinoratte mit 117000 Fasern (FORRESTER und PETERS 1967) und für die pigmentierte Ratte mit 120000 Fasern angegeben (HUGHES 1977). In Analogie zum physiologischen Zelltod der RGC findet auch im NO in der postnatalen Entwicklungszeit eine Abnahme der Axone statt. Die Fasern weisen vom zwanzigsten Embryonaltag (E20) bis zum zehnten postnatalen Tag (P10) einen täglichen Verlust von ca. 17000 Axonen auf (CRESPO et al. 1985). Die ermittelten Werte der Axondurchmesser bewegen sich zwischen $0,437\ \mu\text{m}$ und $5,2\ \mu\text{m}$ (HUGHES 1977). Große Ganglienzellen besitzen die stärksten Axone. Auf elektrophysiologischer Ebene ist mit Hilfe von Messaufzeichnungen der Leitungsgeschwindigkeiten eine Differenzierung in drei Axongruppen möglich (FUKUDA 1977). Die Leitungsgeschwindigkeit ist proportional dem Somadurchmesser. Entsprechend ihrer Herkunft aus dem jeweiligen Retinaquadranten bleiben die Positionen der Axone innerhalb des NO unmittelbar erhalten (BAKER und JEFFERY 1989; YAMADORI 1981). Diese topografische Ordnung geht mit wachsender Distanz vom Bulbus verloren. Im Bereich des *Chiasma opticum* kommt es zu einer Umorientierung der retinalen Nervenfasern, die, tierartspezifisch gekreuzt oder ungekreuzt, den *Tractus opticus* bilden und dann zu den visuellen Zielgebieten, dem *Corpus geniculatum laterale dorsale* und dem *Colliculus superior*, ziehen. In diesen Projektionsorten finden die Verarbeitung und Weitervermittlung der Aktionspotentiale statt. Ungefähr 1,5 % aller

Ganglienzellen der Retina der Albinoratte projizieren in die ipsilateralen Zielgebiete (DREHER et al. 1985). Die ipsilaterale Projektion wird bei pigmentierten Ratten mit 3 % angegeben (JEFFERY 1984). Da es im *Chiasma opticum* auch zu einer Aufzweigung einiger Axone kommt, überschreitet die Axonzahl des *Tractus opticus* die Axonzahl des NO.

2.4 Das retino-tektale System als Modell für Regeneration im ZNS

Das visuelle System der Ratte eignet sich aus vielen Gründen zur Etablierung eines Modells für Regeneration im ZNS. Im Gegensatz zum visuellen System niederer Vertebraten, wie das der Fische und Amphibien, in denen Regeneration mit funktioneller Erholung nach Läsionen beobachtet wurde (SPERRY 1944), steht der optische Nerv der adulten Ratte repräsentativ für das ZNS höherer Säugetiere. Im ZNS der Säuger sind unter natürlichen Bedingungen regenerative Phänomene äußerst selten.

Die Axotomie, d.h. die vollständige Unterbrechung der axonalen Kontinuität von Neuronen, wurde als experimentelles Modell in der Neuroanatomie zur eingehenden Analyse von Degenerations- und Regenerationserscheinungen etabliert (KOLIATSOS und PRICE 1996). Die axonale Durchtrennung liefert nützliche Beispiele, um zelluläre Reaktionen nach einer Schädigung zu analysieren. Mit Hilfe des Axotomiemodells lassen sich einige pathologische Merkmale von neurodegenerativen Schädigungen rekapitulieren, wie Veränderungen in der Zytologie der Neurone und in der Expression spezifischer Gene sowie die Charakteristika des Zelltods.

Man kann bei dieser Form der neuronalen Läsion entsprechend ihrer Art und Weise der Durchführung mechanische und thermische Axotomien unterscheiden. Zu den mechanischen Axotomien zählen die Neurektomie (*cut*) (MADISON et al. 1984; McKERRACHER et al. 1990), die Quetschung (*crush*) (MISANTONE et al. 1984; ALLCUT et al. 1984a und 1984b; BARRON et al. 1986) oder die Zerstörung des Innervationsgebietes (*ablatio*) (MURPHY et al. 1988; BAEHR et al. 1992). Die thermischen Axotomien nutzen z.B. eine intensive Wärmeexposition (Koagulation) (EYSEL et al. 1981; EYSEL und PEICHL 1985).

Das Axotomiemodell der Quetschung des Sehnervs dieser Arbeit soll kontrollierbare und reproduzierbare traumatische Axonschädigungen hervorrufen, um nach einer selektiven Anfärbung von Axonen und retinalen Ganglienzellen aberrante Neubildungen an der axonalen Domäne detektieren zu können.

Die Retina, der NO und die von ihr innervierten Zielgebiete, das *Corpus geniculatum laterale dorsale* und der *Colliculus superior*, gehören zu den am besten untersuchten funktionellen Gehirnsystemen (SEFTON und DREHER 1985). Die große Menge an bereits verfügbaren Daten bildet einen guten theoretischen Hintergrund für weiterführende und aufbauende Untersuchungen im visuellen System der Ratte. Die einzige efferente Verbindung der RGC sind die Axone, die sich

zum NO vereinen. Der extrakraniale Teil des NO ist leicht zugänglich. Der zur intraorbitalen Durchtrennung oder Quetschung erforderliche operative Eingriff ist minimal. Der invasive Eingriff ist zudem relativ einfach und kann schnell durchgeführt werden. Im Vergleich zu anderen ZNS-Läsionen (intrakraniale Zugänge, Rückenmarkverletzungen) beeinträchtigt dieser Eingriff das normale Verhalten der Tiere kaum. Zum einen ist die Belastung für die Tiere gering, zum anderen sind aufgrund des moderaten zeitlichen und materiellen Aufwandes Studien mit entsprechenden Tierzahlen möglich, die die Befunde repräsentativ absichern. Im Gegensatz zu funktionellen Fasertrakten im Gehirn oder im Rückenmark ist der NO nicht von anderen neuronalen Strukturen umgeben. Durch eine vollständige Unterbrechung der Axone im NO ist die Schädigung eines spezifischen und klar definierten zentralen Faserbündels und darüber hinaus auch die Schädigung einer definierten Anzahl von Neuronen der retinalen Ganglienzellschicht möglich. Andere Neurone und Axone werden dabei nicht verletzt. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist der Ausschluss der transneuronalen Markierung. Bei der Applikation von Tracern in das visuelle System kommt es beim anterograden und retrograden Farbstofftransport zu einer uneingeschränkten Markierung der RGC und ihrer Neuriten.

Basierend auf diesen bedeutenden Vorteilen war und ist das Axotomiemodell des visuellen Systems Gegenstand von Studien zahlreicher Arbeitsgruppen (EYSEL et al. 1974; EYSEL und PEICHL 1985; VILLEGAS-PEREZ et al. 1988a und 1988b; SIEVERS et al. 1989; THANOS et al. 1989; SCHMIDT-KASTNER und EYSEL 1994; SEEGER 1995; GELLRICH et al. 1996).

In allen Regionen des ZNS adulter Säuger führen massive Verletzungen zu irreversiblen funktionellen und morphologischen Defiziten, da die meisten der betroffenen Neurone nicht überleben und somit einer progressiv verlaufenden Degeneration unterliegen (AGUAYO 1985; VILLEGAS-PEREZ et al. 1986, 1988b; MEY und THANOS 1993). Ein bis zwei Tage nach der vollständigen Durchtrennung der Axone der Ganglienzellen beginnt eine retrograde Degeneration der Zellen mit Atrophie und Chromatolyse bei allen Säugern (EARYS 1952; MILLER und OBERDORFER 1981; GRAFSTEIN und INGOGLIA 1982; MISANTONE et al. 1984; ALLCUT et al. 1984a und 1984b). Nach wenigen Wochen erfolgt eine fast vollständige Degeneration der retinalen Ganglienzellschicht (RICHARDSON et al. 1982a; MISANTONE et al. 1984; THANOS 1988b).

Mit Hilfe von Markierungstechniken, die eine Identifizierung von RGC ermöglichen, ließen sich quantitative Analysen über den Verlust und das Überleben dieser Neurone nach Axotomie vornehmen. So führte die vollständige intrakraniale Durchtrennung des Sehnervs bei der Maus nach den ersten drei Tagen zu einer Dezimierung der Ganglienzellanzahl um 20 % (GRAFSTEIN und INGOGLIA 1982). Die durchschnittliche Zellgröße verminderte sich um 25 %. Die Untersuchung längerer ÜLZ ergab einen langsamen, aber steten Verlust der RGC. Nach einer postoperativen ÜLZ von zwei bis drei Monaten dokumentierten GRAFSTEIN und INGOGLIA (1982) einen Verlust der Hälfte der Anzahl der RGC, wobei sich die Zellgröße normalisierte. ALLCUT et al. (1984a)

quantifizierten ebenfalls Degenerationen in der Retina der Maus nach Axotomie. Sie nutzten jedoch den intraorbitalen *crush* des NO bei adulten und neonatalen Tieren als Axotomiemodell. Über 80 % der Ganglienzellen degenerierten nach zehn Tagen bei adulten Tieren, während die Degenerationsrate bei neonatalen Mäusen 90 bis 100 % betrug. Diese auch als *Gudden effect* (BRODAL 1940) bezeichnete, auf Neonaten bezogene Sensibilität ist bis heute noch ein weitgehend ungeklärtes Phänomen. Auch die großen RGC waren durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Axotomie gekennzeichnet. Verringerte sich die Anzahl kleiner Zellen nach zehn Tagen um 60 bis 70 % , so wiesen die großen RGC eine Reduktionsrate von 100 % auf. In weiteren Versuchen an Ratten, deren Sehnerv durch einen intrakranialen *crush* geschädigt wurde, veränderte sich die Anzahl der retinalen Ganglienzellen anfangs unauffällig (MISANTONE et al. 1984). In den ersten vier Wochen nach der Läsion konnte lediglich eine veränderte Morphologie an den Ganglienzellen festgestellt werden. Diese unterlagen einer Schrumpfung von 50 % ihres Perikaryonvolumens. Nach drei bis acht Monaten ließen sich erneut Zellen mit großen Perikarya identifizieren, wobei zu diesem Zeitpunkt die Größenverteilung normal war. Eine ultrastrukturelle Analyse des distalen Sehnervs ergab eine vollständige WALLER-Degeneration aller Axone, deshalb konnte die Quetschung als vollständige Axotomie anerkannt werden.

BARRON et al. (1986) nahmen an adulten Sprague-Dawley-Ratten einen intraorbitalen *crush* für 5 s vor. Ihre quantitative Bewertung ergab einen Abfall der Dichte der RGC am 7. Tag auf 65 % und am 180. Tag auf 32 %. Diese Versuche beweisen, dass adulte Ganglienzellen bei einer intakten Blutversorgung auch nach ihrer axonalen Schädigung mehrere Monate überleben können. Die zusätzliche Untersuchung des retinalen Stumpfes mit Hilfe der Silberimprägnation (GRAFSTEIN und INGOGLIA 1982) oder der Elektronenmikroskopie (MISANTONE et al. 1984) ergab die Existenz intakter Axone proximal des Läsionsortes. Diese überlebenden Axone wurden genutzt, um die Lebensfähigkeit der persistierenden Ganglienzellen zu prüfen. HOLLÄNDER et al. (1985) konnten bei der Katze 15,5 Monate nach einer Markierung mit Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) einige RGC in einer durch intrakranialer Neurektomie geschädigten Netzhaut nachweisen. WÄSSLE et al. (1987) fanden dagegen unter gleichen Versuchsbedingungen keine überlebenden Ganglienzellen bei dieser Tierart. Auch beim Kaninchen wurden noch zwei Jahre nach kompletter Durchtrennung ihrer Axone RGC in der Netzhaut dargestellt (SCHERER und SCHNITZER 1991). Bei der Japanischen Wachtel konnten nach zwei bis drei Monaten *post lesionem* 20 bis 30 % axotomieresistente Zellen nach Axotomie nachgewiesen werden (MUCHNICK und HIBBARD 1980).

Die kleinen Ganglienzellen (Typ III-Zellen) sind scheinbar nicht so stark von der Degeneration betroffen (THANOS et al. 1993). Dieser Befund ist ein Beleg dafür, dass die Vulnerabilität nicht bei allen retinalen Ganglienzellen gleich ist (THANOS 1988a).

Die axotomieresistenten Ganglienzellaxone besaßen ein minimales Elongationsvermögen (STEVENSON 1985; ZENG et al. 1994). Das Faserwachstum war aber zeitlich limitiert und nur über sehr kurze Distanzen möglich (RAMON Y CAJAL 1928; RICHARDSON et al. 1982a; ZENG et al. 1994).

Es wurde versucht, durch neuroprotektive Substanzen oder durch neuroregenerative Wirkungen von peripheren Nerventransplantaten die Überlebensfähigkeit von retinalen Ganglienzellen zu erhöhen. Die Axotomie des NO in der Augenhöhle verschiedener Spezies mit anschließender Transplantation eines peripheren autologen Nervensegments an die axotomierte Stelle löste ein Überleben der Perikarya und eine Elongation ihrer Axone aus (RICHARDSON et al. 1982a; SO und AGUAYO 1985; POLITIS und SPENCER 1986; VIDAL-SANZ et al. 1988; THANOS und AGUAYO 1988). Mit Hilfe der anterograden Markierung ließ sich nachweisen, dass die geschädigten RGC in der Lage sind, Axone in das Transplantat einwachsen zu lassen (AGUAYO et al. 1991; WATANABE et al. 1993). Zusätzlich wurden synaptische Kontakte im retino-tektalen Projektionsgebiet gebildet (VIDAL-SANZ et al. 1987; CARTER et al. 1989). Neben den zahlreichen Transplantationsexperimenten an der Ratte, die eindeutig im adulten Gehirn ein Potential an intrinsischer Regenerationsfähigkeit der Nervenzellen zeigen konnten, wurden adäquate Versuche auch an anderen Tierarten vorgenommen. CHO und SO (1992) durchtrennten den Sehnerv des adulten Goldhamsters und transplantierten ein peripheres Nervensegment an den proximalen Nervenstumpf oder implantierten ein kurzes *Nervus peroneus*-Segment in den Glaskörper. Mit diesen Studien gelang es ihnen, die Bildung von *axon-like processes* an retinalen Ganglienzellen zu induzieren. Diese aberranten Fortsätze entsprangen aus unterschiedlichen Teilen der Nervenzelle. Sie hatten ihren Ursprung im Bereich des Somas, der Dendriten oder am intraretinalen Axon. Einige von ihnen waren sogar fähig, im oder entlang des Transplantates zu wachsen (CHO und SO 1989).

Weitere neuroprotektive Maßnahmen konnten das Überleben der RGC positiv beeinflussen. Sowohl der Einsatz des MIF zur Unterdrückung der mikroglialen Aktivität (THANOS et al. 1993) als auch die Verwendung einer Reihe von neurotrophen Substanzen, wie dem NGF (CARMIGNOTO et al. 1989; ZHOU et al. 1996), dem *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (SIEVERS et al. 1987; THANOS et al. 1989), dem BDNF (THANOS et al. 1989; SAWAI et al. 1996) und dem *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) (SENDTER et al. 1992) zeigten einen bemerkenswerten Anstieg neuronaler Regeneration.

2.5 Markierungstechniken

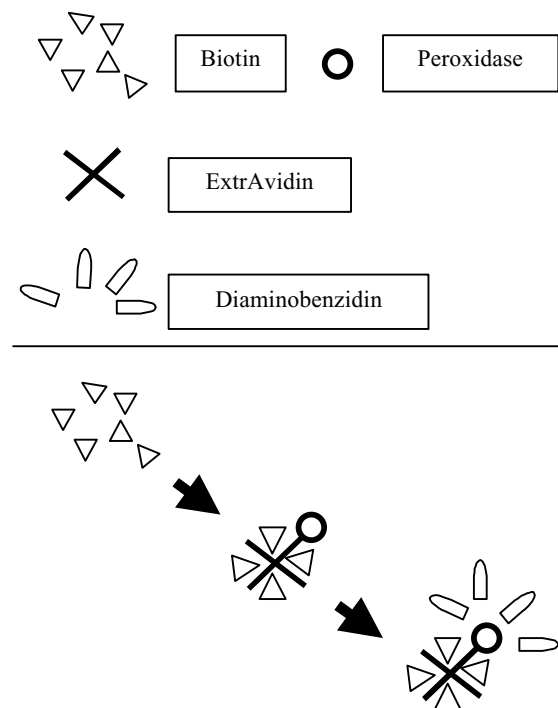
In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff (FFS) *1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate* (DiI) zur Markierung fixierter retinaler Ganglienzellen für die Kontrollexperimente verwendet. DiI ist ein hochlipophiler rot-fluoreszierender

Literaturübersicht

Carbocyaninfarbstoff. Der Vorteil von DiI liegt in seiner hohen Affinität zu fixierten Zellmembranen. Er löst sich in der Lipidproteindoppelschicht aldehydfixierter Nervenzellen und breitet sich anschließend durch laterale Diffusion über die gesamte Zellmembran aus (GODEMENT et al. 1987). DiI erlaubt eine detaillierte Darstellung von Ganglienzellaxonen, Ganglienzellkörpern und Dendriten (THANOS et al. 1991).

Das biotinylierte Dextranamin (BDA) ist ein guter Tracer für anterograde und retrograde Markierungstechniken im ZNS (RAJAKUMAR et al. 1993). Druckinjektionen von BDA in unterschiedliche Teile des Gehirns und des Rückenmarks resultieren in einer Golgi-ähnlichen retrograden und in einer *phaseolus vulgaris leucoagglutinin*-ähnlichen anterograden Markierung. Das BDA wird von geschädigten Axonterminalen, Dendriten oder Zellkörpern aufgenommen und intrazytoplasmatisch in beide Richtungen transportiert (VEENMAN et al. 1992). Die Visualisierung des BDA für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen ist mit Hilfe der ABC-Technik (Avidin-Biotin-Complex; Abb. 5) möglich.

Abb. 5: Schematische Darstellung der ABC-Technik Die Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Die freien Stellen des ExtrAvidins (konjugiert mit einer Peroxidase) ermöglichen die Bindung des biotinylierten Anteils des BDAs. Die Reaktionspartner bilden einen extrem stabilen Komplex. Die Peroxidase, die an das ExtrAvidin gekoppelt ist, wird in der darauffolgenden Enzym-Chromogenreaktion sichtbar gemacht. Als Chromogen wird das 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) verwendet, das in den Nervenzellkörpern und seinen Fortsätzen als deutlich braunes Präzipitat abgelagert wird. DAB ist in Alkohol unlöslich und elektronendicht. Aus diesem Grund werden Ultrastrukturanalysen möglich (BOENISCH 1989).



3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Als Versuchstiere dienten adulte und nicht genotypisierte Albinoratten (*Rattus norvegicus*) aus einer 46. Inzuchtgeneration vom Stamm WISTAR-Prob. Es kamen Tiere beiderlei Geschlechts mit einem Lebendgewicht von 150 bis 200 g zum Einsatz. Die Rattenhaltung erfolgte in Zweiergruppen in Käfigen (Polycarbonat Käfig Typ III, erhöhte Form, mit Edelstahldeckel Typ III, Ehret GmbH Schönwalde), mit Einstreu (Altromin-Tiereinstreu, Faser, Altromin GmbH Lage-Lippe), unter einem künstlichen Lichtregime mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Als Futter standen den Tieren Pellets (Altromin 1324-Haltungsdiät - Ratten und Mäuse, Altromin GmbH Lage-Lippe) und als Tränke Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle genehmigungspflichtigen Versuche sind mit Zulassung des Regierungspräsidiums Leipzig durchgeführt worden (TVV-Nr. 6/97). Über die Durchführung der Operationen wurde gemäß § 9a Abs. 1 des Tierschutzgesetzes Protokoll geführt.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden 37 Tiere eingesetzt, deren Verteilung auf die einzelnen Experimente sich wie folgt aufschlüsselt:

- Kontrollexperimente: DiI-Markierung fixierter Ganglienzellen 3 Tiere
- Läsionsexperimente: *Nervus opticus-crush* 34 Tiere

3.2 DiI-Markierung nicht axotomierter retinaler Ganglienzellen

Für die analytisch-qualitative Beurteilung retrograd geschädigter RGC bedurfte es einer Vergleichsstudie zur Nervenfasermorphologie der normalen Netzhaut. Die Aufnahme des BDA durch Neurone setzt eine Schädigung der Zellmembran voraus, sodass BDA für Kontrollversuche nicht genutzt werden kann. Aus diesem Grund wurde für die Kontrollexperimente der Fluoreszenzfarbstoff DiI gewählt.

Nach der Euthanasie der Tiere wurden die Augen enukleiert und die Retinae freipräpariert. Die Präparation der Kontrollnetzhäute erfolgte in gleicher Weise wie bei den geschädigten Retinae (vgl. Abschnitt 3.6).

Die isolierte Retina wurde mit vier radiären Einschnitten in Form eines Kleeblatts (*whole-mount*) flächenhaft auf einem mit Polylysine (Poly-L-lysine solution, Sigma Diagnostics, St. Louis [USA]) beschichteten Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schuell, NC 60, Membranfilter, Dassel)

ausgebreitet. Die Ganglienzellschicht befand sich oben. Nachdem das Gewebe sicher auf dem Filter platziert und der Glaskörper vollständig entfernt wurde, gelangten die Proben in die Immersionsfixierung. Für mindestens zwölf Stunden lagerte der netzhautbeschichtete Filter bei 4°C in einer Fixierlösung aus 3,7 % Paraformaldehyd, PA, in 0,1M Phosphatpuffer, PP (pH 7,4; GODEMENT et al. 1987).

Am darauffolgenden Tag wurden die Retinae aus dem Fixans genommen und die überschüssige Flüssigkeit mit einem trockenen Filter nach unten abgesaugt. Zur fluoreszenzmikroskopischen Markierung der Neurone wurde der lipophile Farbstoff DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate D 282, Molecular probes, Eugene, Oregon) eingesetzt. Die DiI-Kristalle wurden mit einer spitzen Skalpellklinge auf die optische Faserschicht nahe der optischen Papille appliziert. Beim erneuten Überführen der Netzhäute in die Fixierlösung konnte durch behutsames Vorgehen ein Abschwemmen der Kristalle verhindert werden. Die Lagerung erfolgte unter Lichtabschluss bei Zimmertemperatur. Nach vier Wochen waren erste Ergebnisse dokumentierbar.

3.3 Intraorbitale Quetschung des Sehnervs - *Nervus opticus-crush* (erster invasiver Eingriff)

Die intraorbitale Quetschung des Sehnervs wurde am narkotisierten Tier nach ordnungsgemäßer Überprüfung der Schmerzfreiheit vollzogen. Nachdem die Ratte in einer kurzen Äthernarkose (Diethylether, Roth, Karlsruhe) sediert worden war, erfolgte die Injektionsnarkose von 30 mg/kg Ketamin (Exalgon®1000, Rhône Mérieux) und 15 mg/kg Xylazin (Rompun® TS, Bayer Leverkusen) durch eine intramuskuläre Applikation.

Während des gesamten Eingriffs lag das Tier fixiert auf einer Isolierschicht aus Styropor, um dem in der Anästhesie befürchteten Wärmeverlust entgegen zu wirken. Weiterhin wurde der Ratte ein 0,5 cm dicker Plastikstab zur Vorbeuge des Erstickens zwischen Ober- und Unterkiefer geschoben. Um ein Austrocknen der Hornhaut perioperativ zu verhindern, wurden beide Augen mit einer Augensalbe (Retinalpalmitat-Thiaminchloridhydrochlorid-Kalziumpanthenat, Regepithel Augensalbe, Alcon Thilo, Freiburg) benetzt. Die Versuche sind mit einem Operationsmikroskop (OP-Mikroskop, Carl Zeiss Jena) durchgeführt worden.

Mit Hilfe eines stumpfen Skalpells wurde oberhalb der freirasierten *Regio frontalis* des rechten Auges parallel zur Medianlinie ein ca. 2 cm langer Schnitt sagittal angelegt. Es folgte das Abpräparieren der Haut von der darunter liegenden Muskulatur und das Durchtrennen der Muskelschicht bis zum *Margo supraorbitalis*. Die freie Haut wurde seitlich mit drei Heften weggespannt. Nun wurde die ventral des *Margo supraorbitalis* gelegene voluminöse *Glandula lacrimalis* (HARDER-Drüse) teilweise reseziert. Die darunter befindlichen Muskeln (*M. levator*

palpebrae superior und *M. rectus dorsalis*) wurden durchtrennt. Der noch seiner Bindegewebshülle mit eingelagertem *M. retractor bulbi* eng anliegende *Nervus opticus* wurde dadurch am Boden der Operationshöhle sichtbar (Abb. 6). Die Präparation der den Sehnerv unmittelbar umgebenden Strukturen erleichterte die weitere Orientierung. Nach seiner Feinpräparation wurde dieser mit Hilfe einer gebogenen Pinzette 5 mm hinter dem Bulbus umfasst und für etwa 30 s mit einer moderaten Druckstärke gequetscht. Als gelungene Operationskontrolle ließ sich der durch das intakte Epineurium hindurchschimmernde weiße *Nervus opticus* ausfindig machen, dessen Stümpfe sich deutlich voneinander entfernten. Die entstandene Wundhöhle wurde mit kleinen Gelasponschwämmen ausgefüllt, mit sulfonamidhaltigem Pulver versorgt und mit resorbierbarem Nahtmaterial dicht verschlossen. Der Nachweis von mindestens zehn Fundusgefäßen schließt eine operationsbedingte Retinaischämie aus.

3.4 Intraorbitale Axotomie des Sehnervs (zweiter invasiver Eingriff)

Die Durchführung des zweiten operativen Eingriffs, drei Tage vor der transkardialen Perfusion, erlaubt die spezifische Darstellung der überlebenden Ganglienzellen und ihrer aberranten Prozesse an den Axonen. Diese Markierung war nötig, um die entsprechenden Strukturen licht- und elektronenmikroskopisch veranschaulichen zu können.

An der narkotisierten Ratte wurden in Analogie zum NO-crush die retrobulbären Augenstrukturen bis zur Identifizierung des gequetschten Sehnervs freigelegt (Abb. 7). Nach der Feinpräparation des Nervs erfolgte im Anschluss ein longitudinaler Einschnitt an der Quetschstelle, um die retinale Blutversorgung aufrechtzuerhalten. Ein 3 bis 4 mm langer Schnitt des Epineuriums war zum Erfassen und zum Anheben des okulären Sehnervstumpfes ausreichend. Es folgte das Anschneiden des Stumpfes mit einem spitzen Skalpell. Ein mit 5 µl 20-prozentigem BDA (dextran biotin, 10,000 MW, Molecular Probes) getränktes Gelasponschwämmchen wurde unter mikroskopischer Kontrolle auf den okulären Sehnervstumpf platziert. Anschließend wurde die Wundhöhle *lege artis* versorgt und verschlossen. Mit Hilfe eines benetzten Deckgläschens und dem Operationsmikroskop wurde die ophthalmoskopische Fundusbeurteilung zur Überprüfung einer ausreichenden Blutversorgung der Retina durchgeführt.

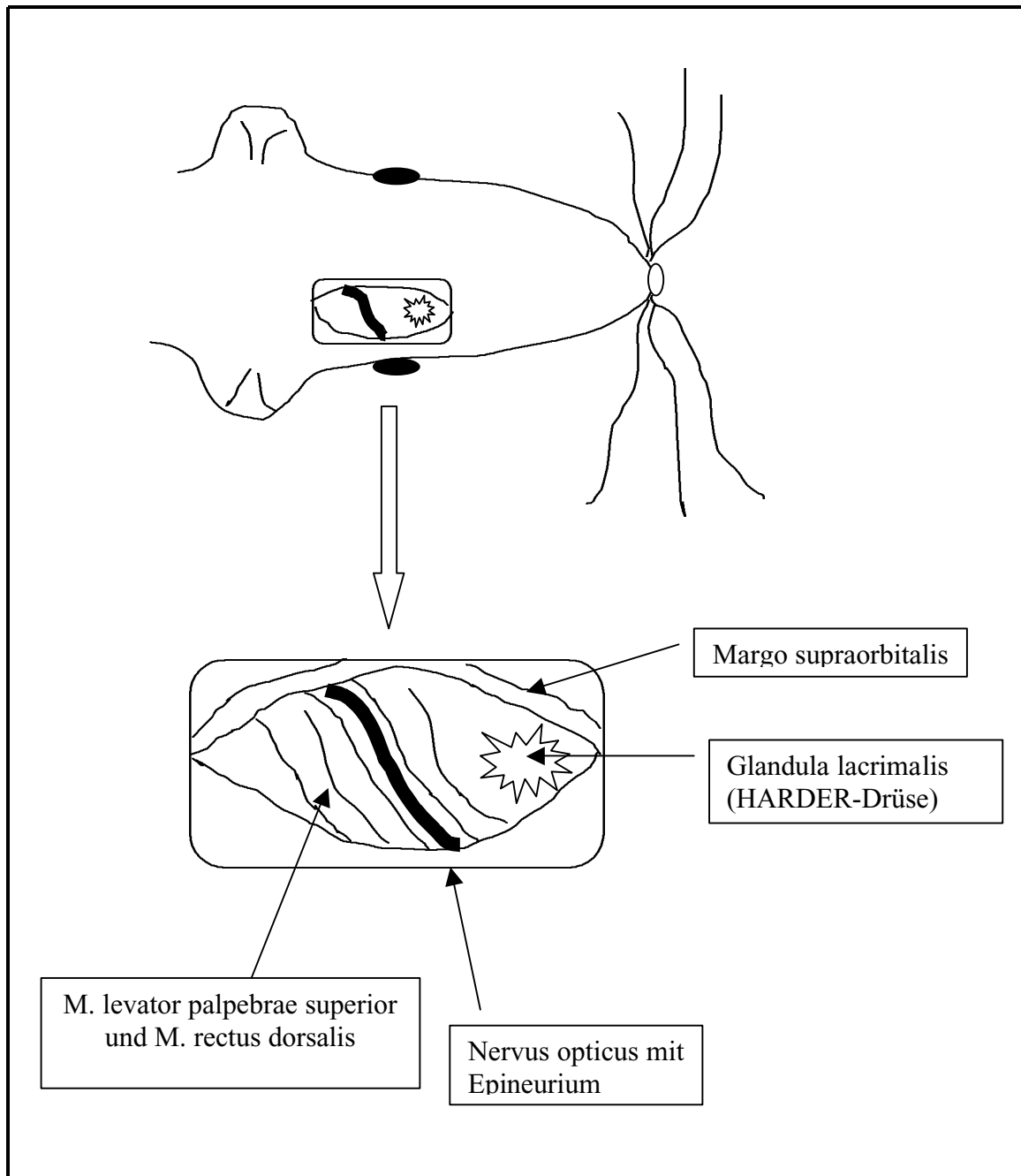


Abb. 6: Schematische Darstellung der *Regio frontalis* (oben) als Operationslokalisation und der retrobulbären Augenstrukturen (unten) während der Quetschung des *Nervus opticus* zur Auslösung einer retrograden Degeneration der RGC. Beim *Nervus-opticus-crush* bleibt das Epineurium vollständig intakt.

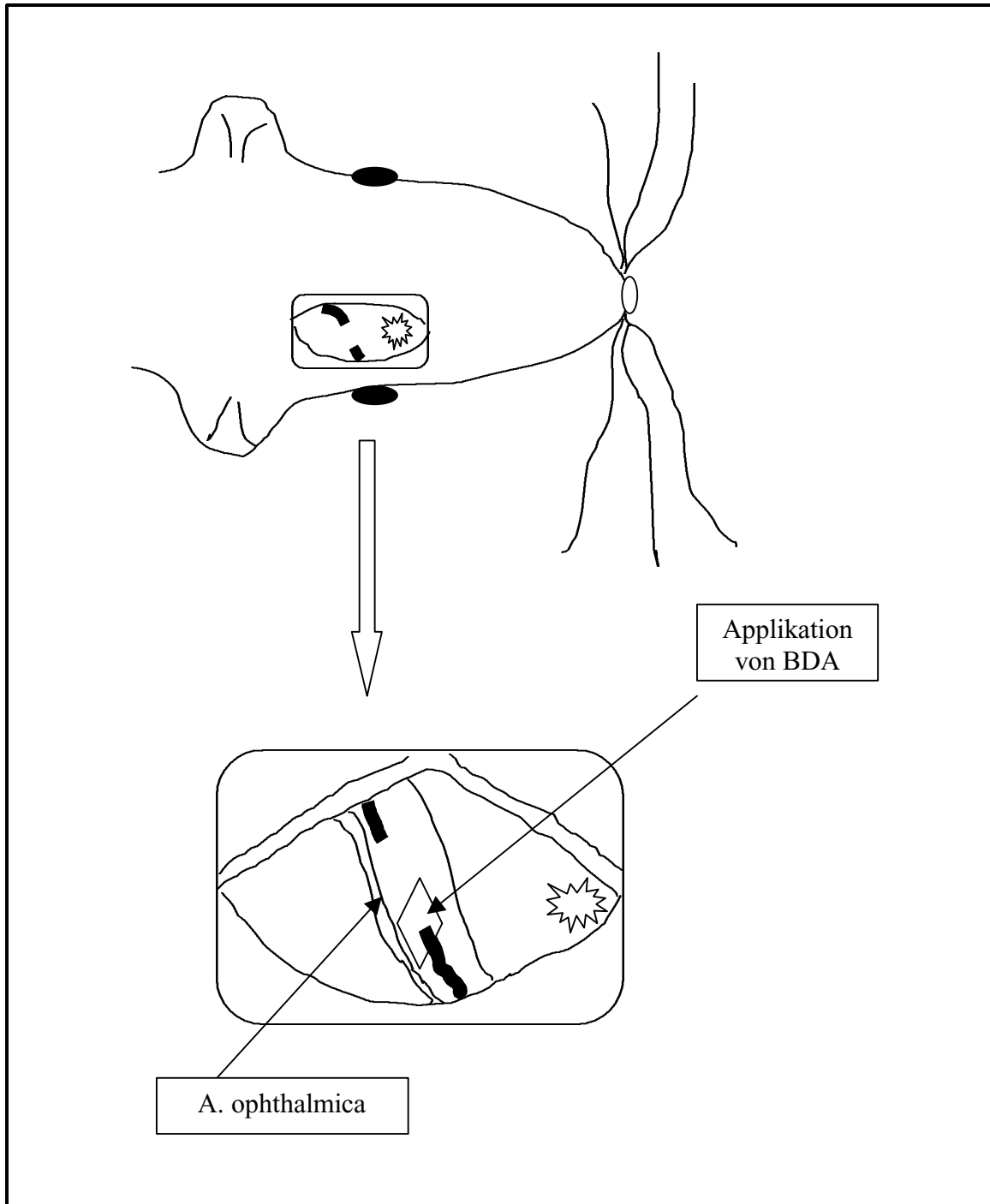


Abb. 7: Schematische Darstellung des zweiten invasiven Eingriffs zur Markierung der überlebenden Ganglienzellen und ihrer Axone mit BDA. Erneutes Freilegen der retrobulbären Augenstrukturen mit longitudinaler Eröffnung des Epineuriums unter Schonung der *A. ophthalmica*.

3.5 Perfusionsfixierung

Drei Tage nach dem zweiten invasiven Eingriff folgte die transkardiale Perfusion der Tiere nach Eröffnung des Brust- und vorderen Bauchraumes. Die *Aorta descendens* und die *Vena cava caudalis* wurden mit Péan-Klemmen abgebunden. Das Einführen einer Kanüle in die linke Herzkammer erlaubte das Einbringen der Spül- und Fixierlösung in den Blutkreislauf. Die Eröffnung der rechten Vorkammer im Bereich des Herzohrs garantierte einen entsprechenden Abfluss. Die sich anschließende Perfusion erfolgte mit einer IPC-Peristaltikpumpe (IPC-8, IMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld). Zunächst wurden die Blutgefäße mit ca. 50 ml einer 0,1M PBS-Lösung, versetzt mit Natrium-Heparin, vorgespült. Dann wurde die Perfusion mit ca. 400 ml eines Fixans, bestehend aus 4 % PA in 0,1M PBS (pH 7,4), fortgesetzt.

3.6 Präparation und Immersionsfixierung der Netzhaut

Die Präparationsschritte erfolgten an in Pufferlösung liegendem Gewebe mit einem Stereomikroskop. Der Spülpuffer 0,1M PBS (pH 7,4) wurde nach jedem Schritt erneuert. Nach Skalpelleinschnitt am Limbus wurde mit der Mikroschere ein zirkulärer Schnitt angelegt. Dabei wurde der vordere Teil des Augapfels, die Cornea und die Linse, entfernt. Die an Choroidea und Sclera verbleibende Retina löste man vorsichtig mit einer feinen Pinzette und einer Mikroschere. Häufig besaß die Netzhaut am *Discus nervi optici* einen festen Kontakt zum Augapfel. Hier wurde sie abgeschnitten und bewegte sich nun frei in der Spülflüssigkeit. Die Netzhaut wurde in gleichgroße Quadranten zerteilt, die anschließend auf einem mit Polylysine getränkten Nitrozellulosefilterstück ausgebreitet wurden. Die Ganglienzellschicht kam auf der dem Präparator zugewandten Seite zu liegen. Um den Retinaquadranten eine optimale Haftung auf dem Filter zu ermöglichen, wurde der gewebebeschichtete Filter auf einem trockenen Filter abgelegt, um die Flüssigkeit abzusaugen. An dieser stabilisierten Netzhaut ließ sich nun mit Hilfe von benetzten Filterecken der transparente Glaskörper abziehen. Anschließend wurden die Proben in die Immersionsfixierung überführt. Nach zweistündiger Fixierung in 3,75 % Acrolein und 4 % PA in 0,1M PBS (pH 7,4) erfolgte eine Nachfixierung in 4 % PA in 0,1M PBS (pH 7,4). Die Proben wurden über Nacht bei 4°C weiter fixiert, bevor mit der ABC-Technik begonnen wurde.

3.7 Lichtmikroskopische Darstellung der Nervenfasern- und Ganglienzellschicht

Die Methodik der Visualisierung für die Hellfeldmikroskopie erfolgte mit der ABC-Technik (Abb. 5). Die Retinaquadranten wurden im *cell well* jeweils zweimal 10 min in 0,01M PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend 18 min in eine 1-prozentige Natriumborhydridlösung (100

mg in 10 ml PBS gelöst) verbraucht. Nach dem fünfmal 5-minütigen Waschvorgang mit PBS wurden die Proben mit dem Enzym Peroxidase (ExtrAvidin-Peroxidase, Sigma E-2886, St.-Louis [USA]) 1:1000 in PBS mit 1-prozentigem BSA (Bovine serum albumine, Sigma A-7030, St.-Louis [USA]) versetzt. Die Inkubation erfolgte flottierend bei 4°C.

Am darauffolgenden Tag begann der zweite Schritt der ABC-Technik mit dem Waschen der Proben zweimal 10 min mit 0,01M PBS (pH 7,4) und anschließend 10 min in 0,05M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6). Die Präparate reagierten danach 5 min mit 0,05-prozentigem 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) (Fluka Chemikalien 32750, Deisenhofen) in Tris-HCl-Puffer (0,05M; pH 7,6). Bei der zweiten DAB-Reaktion wurde das DAB 1:1000 mit H₂O₂ (1:1 in *A. bidest*) gemischt. Die Dauer der zweiten DAB-Reaktion betrug nach der mikroskopischen Kontrolle 3 bis 10 min. Nach Erreichen einer optimalen Markierung der Neurone und ihrer Fortsätze wurde mit 0,01M PBS (pH-7,4) fünfmal 5 min die ABC-Technik gestoppt.

Als Eindeckmedien kamen Kanada-Balsam oder Entellan zum Einsatz. Die Präparate konnten somit für die Lichtmikroskopie dauerhaft aufbewahrt werden. Die eingedeckten konvertierten Präparate wurden unter Nutzung der Differential-Interferenz-Kontrast-Optik (Nomarsky-Technik) am Axiophot (Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen) präzise durchmustert. Mit Hilfe der Nomarsky-Optik ließ sich ein pseudodreidimensionales Bild erzielen. Für die Photodokumentation ausgewählter Bereiche wurden Farbdiafilme (Ektachrome 64T, Kodak) und Schwarz-Weiß-Negativfilme (APX 25, Agfa) verwendet.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung und die Photodokumentation der DiI-markierten Kontrollnetzhäute wurden am Axiophot durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampflampe (HBO-100 W, Osram, Carl Zeiss, Oberkochen). Das Licht wurde durch einen Fluoreszenzfiltersatz (Anregungsfilter BP 510-560, Farbteiler FT 589 und Sperrfilter CP 590) geführt. Die Befunde wurden auf Farbfilmern für Fluoreszenzmikroskopie (Ektachrome 400x, Kodak) dokumentiert.

3.8 Grafische Darstellung ausgewählter Befunde

Ein computergestütztes Bildanalysesystem Analysis (Analysis-[SIS] Münster) und eine an das Axioskop (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) adaptierte und an das Analysesystem gekoppelte Videokamera gestatteten eine schnelle und differenzierte Erhebung morphologischer Befunde der BDA-markierten RGC. Das Grafikprogramm CorelDRAW 8 stand zur Rekonstruktion der aberranten Fortsätze zur Verfügung.

3.9 Elektronenmikroskopische Darstellung

Die ausgewählten Bereiche wurden mit dem Analysesystem lückenlos dokumentiert, um die aberranten Neubildungen wiederzufinden. Die Präparate wurden zuerst 60 Minuten bei 4°C in 1-prozentigem Osmiumtetroxid (Osmium tetroxide, OsO₄, Fluka) in Phosphatpuffer (0,1M, pH 7,4) fixiert. Anschließend wurden die Proben zweimal 15 min in 0,1M PP (pH 7,4) gespült. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 30-prozentigem, 50-prozentigem, 70-prozentigem, 90-prozentigem, 96-prozentigem und absolutem Alkohol für eine Zeitdauer von jeweils 30 min. Zur Erzielung eines besseren Kontrastes wurden dem 70-prozentigem Alkohol Uranylacetat (100 mg in 10 ml Alkohol, Uranyl acetate, Serva) über 45 min bei 4°C zugesetzt. Die Entwässerung der Proben wurde mit Propylenoxid (Propylene oxide, Serva), dreimal 10 min, beendet.

Die Einbettung in Kunstharz (Durcupan® ACM Fluka, Neu-Ulm) basierte auf dem entsprechenden Fluka-Protokoll (Fluka Chemie AG, Buchs). Zwischen zwei Kunststofffolien polymerisierten die Proben 48 Stunden bei 80°C. Anschließend konnte mit Hilfe des computergestützten Analysesystems eine Videodokumentation mit Markierung der zu untersuchenden Struktur in dem osmierten und eingebetteten Gewebe vorgenommen werden. Zur Weiterverarbeitung wurden die Präparate auf Durcupanblöcke aufgeklebt und erneut 48 Stunden bei 80°C gelagert. Mit einem Ultratrimmgerät (Reichert, Ultratrimm, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim) wurden 50 nm dicke Proben geschnitten. Die ultrastrukturelle Auswertung fand am Elektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss, Oberkochen) statt. Für die Anfertigung der Schnittbildserien, die mit Hilfe einer CCD-Kamera aus digitalisierten Bildern aufgenommen wurde, nutzten wir das EM (912 OMEGA, LEO, Oberkochen) des Paul-Flechsig-Instituts für Hirnforschung, Leipzig.

4 Ergebnisse

4.1 Lichtmikroskopische Befunde der Kontrollnetzhaut

Die folgenden Abbildungen sind Aufnahmen einer nicht axotomierten Retina der adulten Albinoratte. Es handelt sich um Aufnahmen peripherer Gebiete, da die um den *Discus nervi optici* positionierten DiI-Kristalle zu einer sehr intensiven Fluoreszenz der zentralen Anteile der Retina führten. Dargestellt wurden DiI-markierte RGC und ihre Nervenfasern der ungeschädigten Netzhaut (Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10). Deutlich erkennbar waren die parallel in Bündeln verlaufenden Ganglienzellaxone. Sie bildeten Axonfaszikel und strebten konvergierend aus der Netzhautperipherie dem *Discus nervi optici* zu (Abb. 8). Im Bereich der *Area cribosa sclerae* formierten sie sich zum *Nervus opticus*. Zwischen den Faszikeln lagen die markierten Somata der RGC. Diese räumlich radiär erscheinende Anordnung ist charakteristisch für die halbkugelförmige Retina. Es waren stark fluoreszierende von schwach fluoreszierenden Perikarya zu unterscheiden. Die Übergänge der Dendriten aus den Zellkörpern ließen sich durch den gewählten Fokus nicht eindeutig identifizieren.

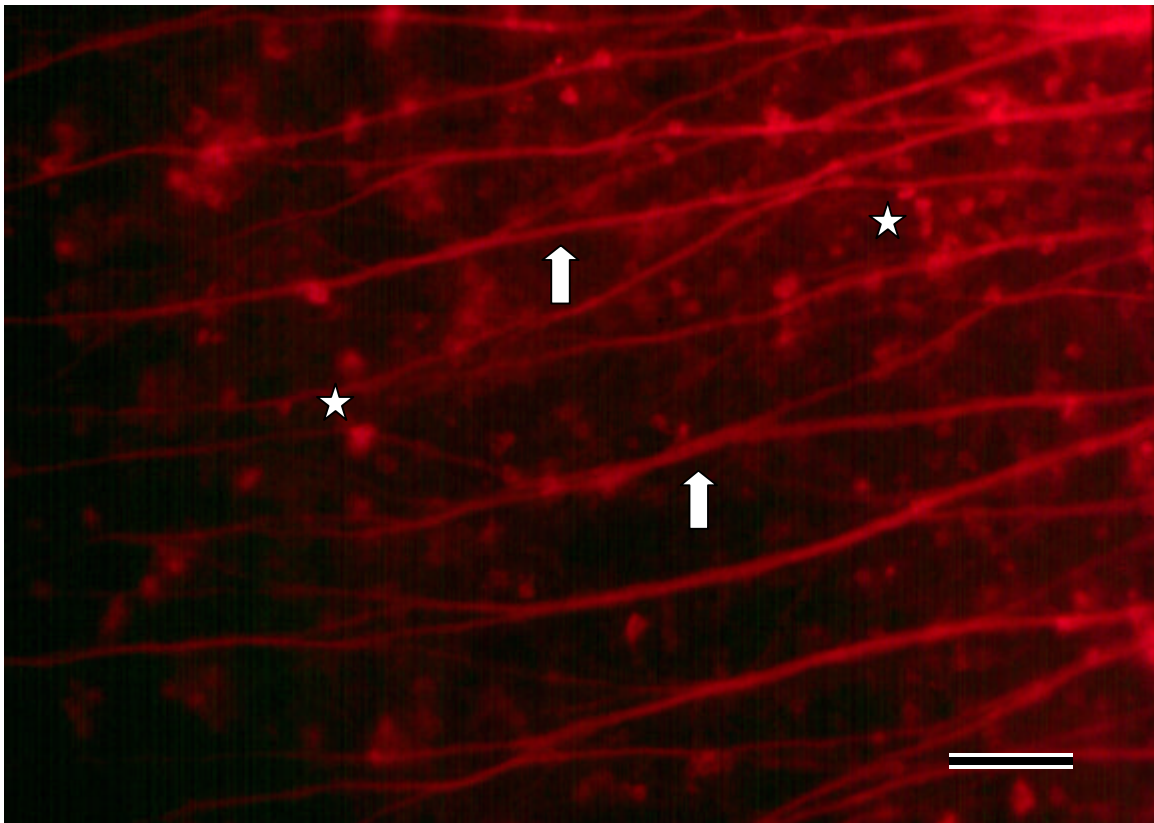


Abb. 8: DiI-markierte RGC und Nervenfasern einer nicht axotomierten Retina einer adulten Albinoratte. Die Nervenfasern streben konvergierend aus der Retinaperipherie (linke Bildseite) zum *Discus nervi optici* (rechte Bildseite). Die Nervenfasern ziehen parallel und vereinigen sich zu Axonfaszikeln (Pfeile). Zwischen den Faszikeln liegen die fluoreszenzmarkierten Somata der RGC (Sterne). Balkenlänge: 25 µm.

Zahlreiche Nervenfasern verliefen über eine lange Distanz im Faszikel. Einige Axone traten auch aus einem Faszikel aus und legten sich den gebündelten Nachbaraxonen an. Ein Teil der Nervenfasern wies in ihrem Verlauf deutliche Kontinuitätsunterschiede ihres Durchmessers, sogenannte Schwellungen, auf. Schwellungen waren an wechselnden separaten Axonen und an den Axonen, die in einem Faszikel verliefen, zu erkennen (Abb. 9 und Abb. 10). Zwischen den Schwellungen erschien der Axonschaft glatt und gleichmäßig konturiert. Einige Axone jedoch hatten durchgehend eine glatte Oberfläche und waren von gleichmäßigem Durchmesser.

RGC, bei denen keine Axotomie durchgeführt wurde, zeigten demnach keine uniforme Morphologie im Bereich ihrer axonalen Fortsätze.

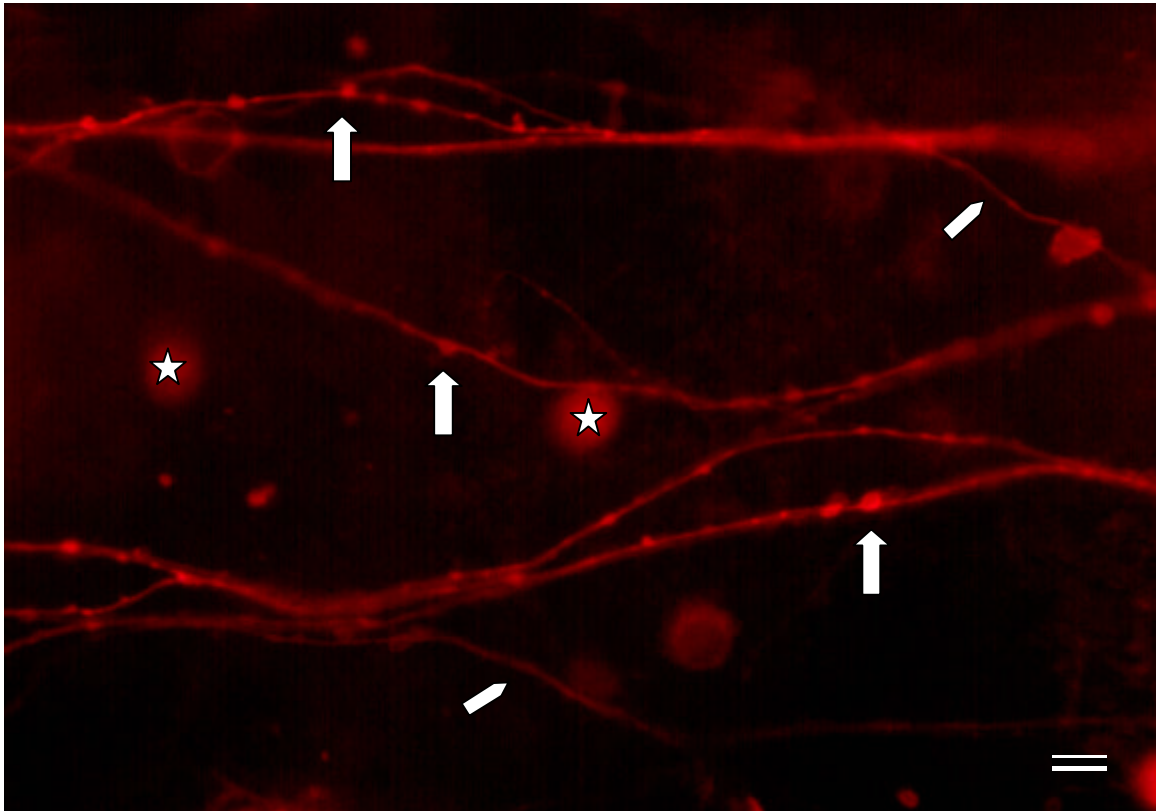


Abb. 9: DiI-markierte Nervenfasern und RGC einer nicht axotomierten Retina. Der Fokus ist auf die NFL eingestellt und somit lassen sich morphologische Details an den Axonen feststellen. Die Nervenfasern zeigen deutliche Kontinuitätsunterschiede ihres Durchmessers, sogenannte Schwellungen (Pfeile). Zwischen diesen Nervenfasern lassen sich Axone ohne Schwellungen erkennen (Richtungspfeile). Die RGC zwischen den Axonen erscheinen defokussiert (Sterne). Balkenlänge: 10 μm .

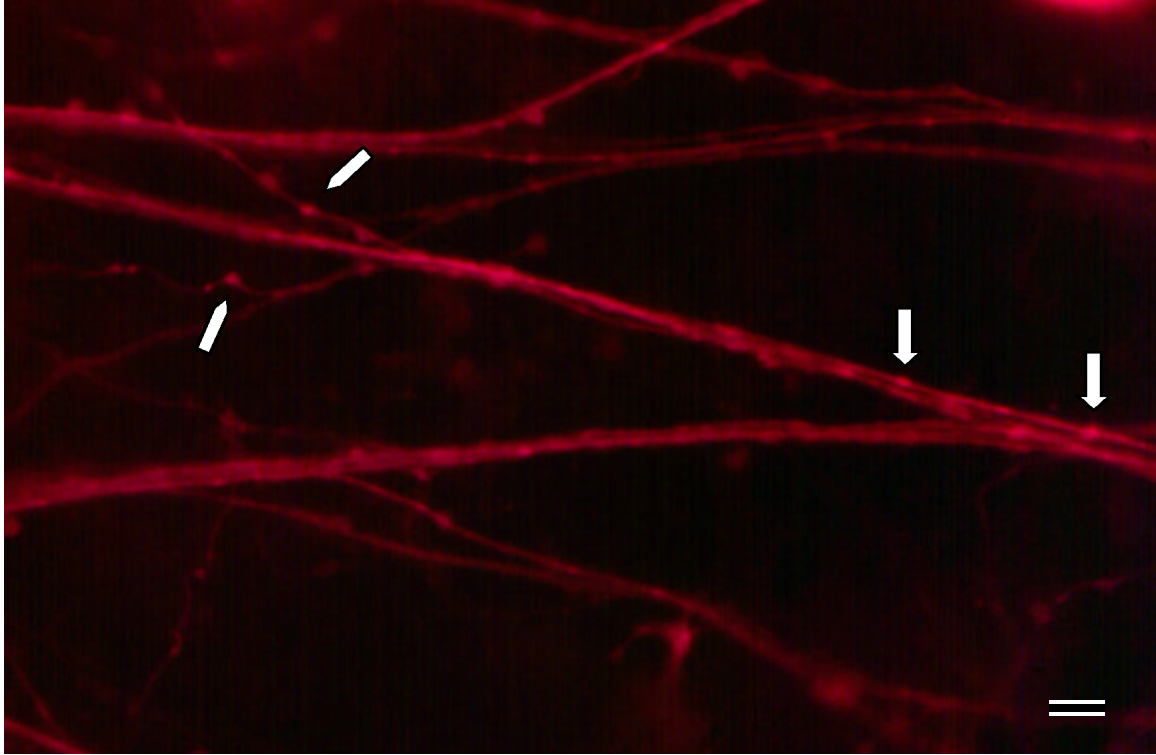


Abb. 10: DiI-markierte Nervenfasern einer adulten Ratte ohne Axotomie des *Nervus opticus*. Schwellungen an den Nervenfasern der RGC treten sowohl an den Axonen in einem Faszikel (Pfeile) als auch an separaten Axonen (Richtungspfeile) auf. Balkenlänge: 10 μ m.

4.2 Lichtmikroskopische Befunde der axotomierten Netzhaut

Die Quetschung des Sehnervs erfolgte intraorbital. Die überlebenden RGC mit ihren aberranten Fortsätzen wurden durch BDA intrazytoplasmatisch markiert. Die Tiere wurden in Gruppen mit je zwei bis drei Ratten pro gewähltem ÜLZ eingeteilt (Tab. 1).

Für eine komplette qualitative Darstellung wurden möglichst viele Zeitabschnitte dokumentiert, um Aussagen über den zeitlichen Verlauf neugebildeter Fortsätze der axotomierten Netzhaut treffen zu können.

ÜLZ	3 d	10 d	2 Wo	3 Wo	4 Wo	8 Wo	12 Wo	6 Mo	12 Mo
Tierzahl	3	3	3	3	3	2	2	2	3

Tab. 1: Tieranzahl pro ÜLZ beim *Nervus opticus-crush*

Folgende Ergebnisse an geschädigten RGC konnten ermittelt werden:

- Schwellungen (*swellings*)
- Dornenförmige Fortsätze (*spine-like processes*)
- Axonsprosse mit Wachstumskegeln (*axonal sprouts, growth cones*)
- Axonkollateralen (*axonal collaterals*)
- Schleifenaxone (*looping axons*)

4.2.1 Schwellungen

Das Auftreten von axonalen Schwellungen (*swellings*) war auf lichtmikroskopischer Ebene zu allen ÜLZ sichtbar. Sowohl in den kurzen als auch in den langen postoperativen Zeiten stellten sie eine auffällige Struktur der Axone dar. Sie variierten in ihrem Erscheinungsbild. Es konnten Schwellungen von spindelförmiger Gestalt von solchen mit markanten blasigen Auftreibungen unterschieden werden. Insbesondere die Schwellungen des intraretinalen Schleifenaxons präsentierten sich in variabler Form und beachtlicher Größe (Abb. 34). Entsprechend ihrer Morphologie konnten die Schwellungen systematisiert werden als:

- spindelförmig (Abb. 11 und Abb. 12)
- ballonierend (Abb. 12)
- breitbasig polypös (Abb. 12 und Abb. 34)

Nach ÜLZ von zehn Tagen, zwei und drei Wochen waren Schwellungen häufig dokumentierbar. Mehrere hintereinander lokalisierte Schwellungen verliehen dem Axon ein Perlenketten ähnliches Aussehen. In diesen Fällen spricht man von Perlschnuraxonen (*beading*) (Abb. 13). Sowohl in den zentralen als auch in den peripheren Netzhautgebieten konnten Schwellungen identifiziert werden. Nicht an allen Axonen waren Schwellungen zu erkennen (Abb. 13). Im Rahmen dieser Versuchsreihen waren sie wiederholt als Ursprung für das Entstehen von dornenförmigen Fortsätzen (Abb. 14 und Abb. 15) und von intraretinalen Kollateralen (Abb. 25 bis Abb. 30) zu erkennen.

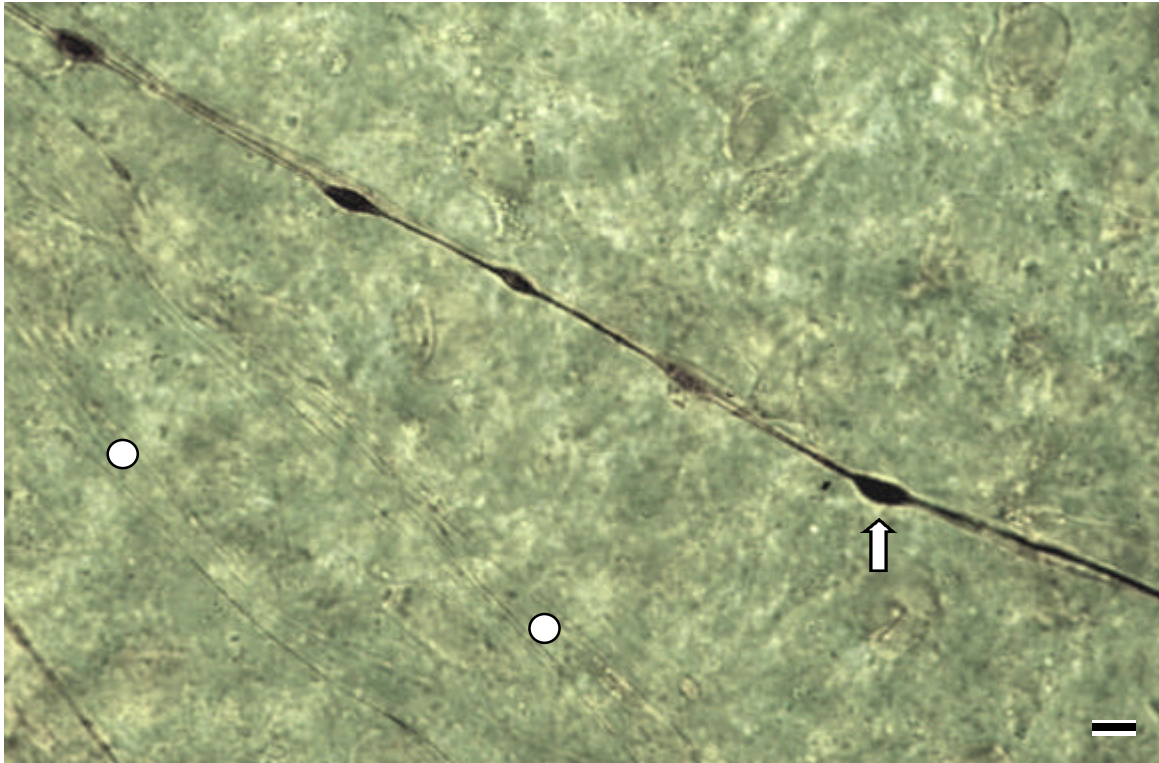


Abb. 11: Aufnahme einer BDA-markierten Nervenfaser drei Wochen nach einer intraorbitalen Quetschung des *Nervus opticus*. Die sehr deutlich markierte Faser ist durch das Auftreten spindelförmiger Schwellungen charakterisiert (Pfeil). In unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich ein unmarkierter Axonfaszikel (Kreise). Balkenlänge: 5 μ m.

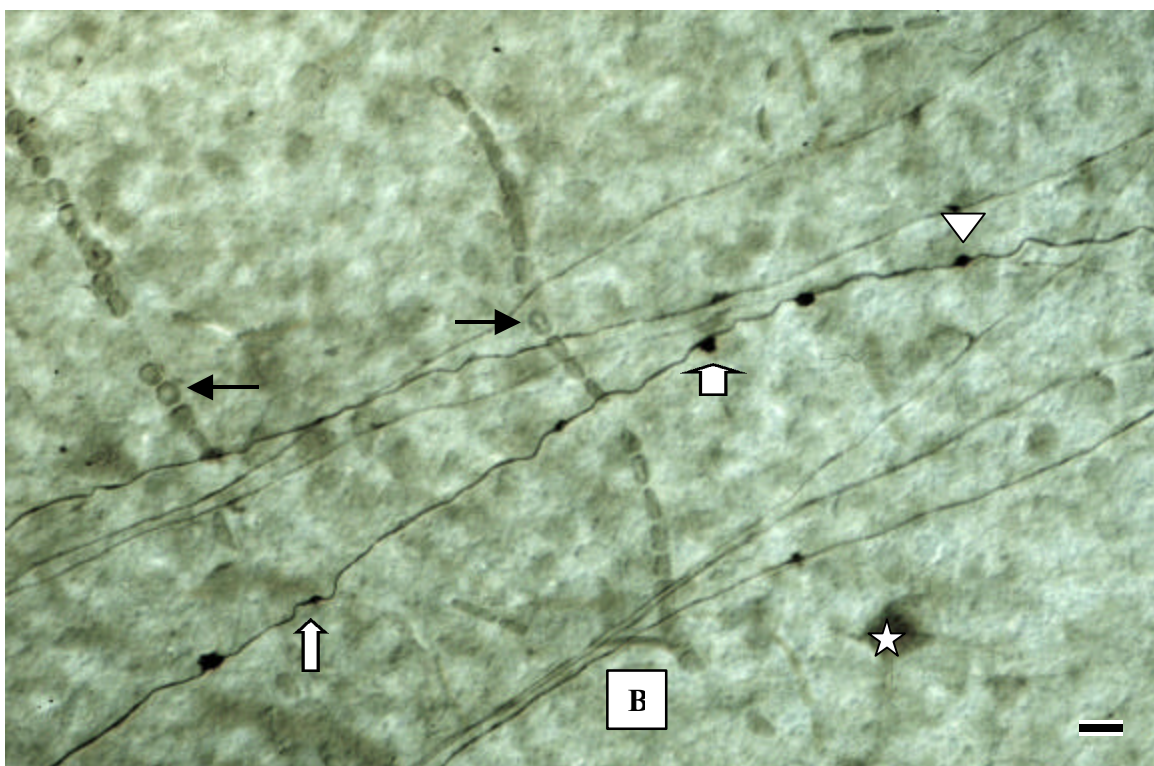


Abb. 12: BDA-markierte Netzhaut drei Wochen nach einem *Nervus opticus-crush*. Es ist eine Nervenfaser mit morphologisch unterscheidbaren Schwellungen zu erkennen. Es lassen sich spindelförmige (langer Pfeil), ballonierende (Pfeilkopf) und breitbasig polypöse Schwellungen (dicker Pfeil) eindeutig differenzieren. In der rechten unteren Bildhälfte sieht man eine RGC (Stern) und ein verzweigendes Blutgefäß (B). Die Erythrozyten in den Kapillaren sind aufgrund ihrer endogenen Peroxidasereaktion ebenfalls markiert (schwarze Pfeile). Balkenlänge: 5 μ m.

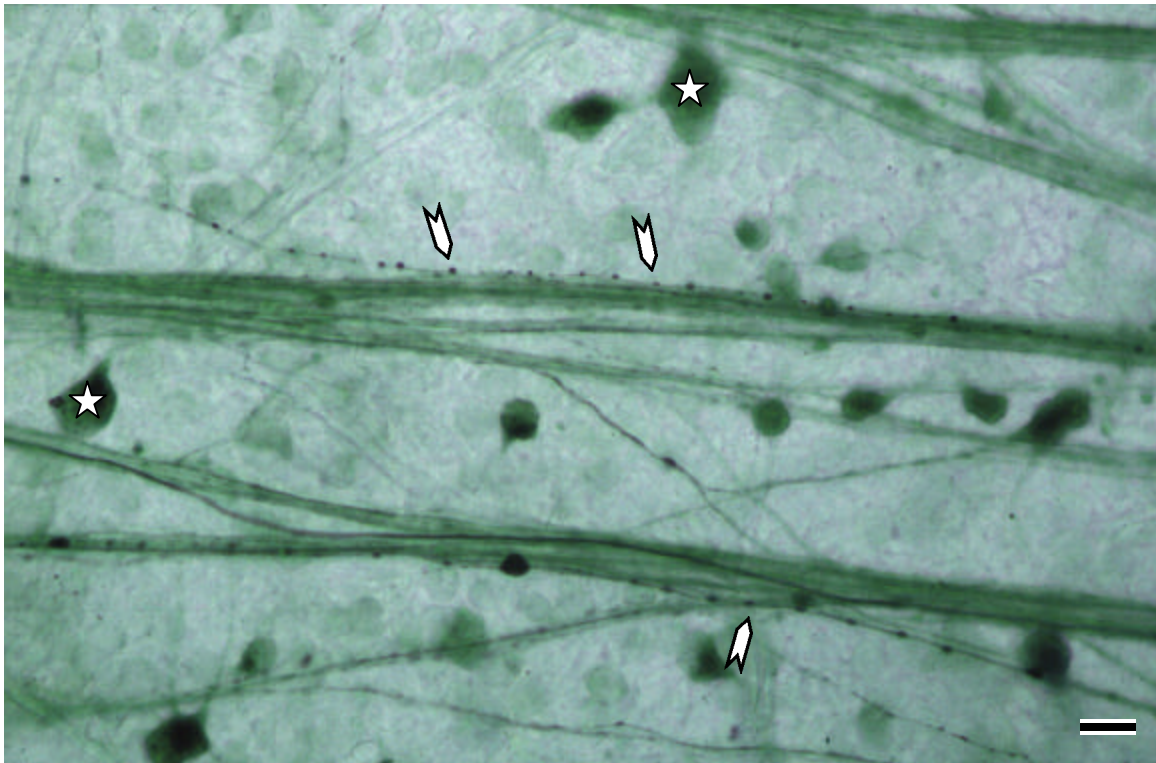


Abb. 13: Zehn Tage nach einem *Nervus opticus-crush* lassen sich in der Netzhaut der adulten Ratte Perlschnuraxone dokumentieren (eingebuchtete Richtungspfeile). Es sind einige große und mittlere Somata der RGC (Sterne) markiert. Ihr Dendritenbaum befindet sich nicht im Fokus. Balkenlänge: 10 μm .

4.2.2 Dornenförmige Fortsätze

Ein weiterer morphologischer Befund waren aberrante Fortsätze in Form von Dornen (*spine-like processes*). Es handelte sich um einen kurzen axonalen Auswuchs mit einer Länge von 5 μm , der nach postoperativen ÜLZ von drei Wochen und sechs Monaten in einer axotomierten Netzhaut dargestellt wurde. Dornenförmige Fortsätze befanden sich im Bereich von Schwellungen des Axons (Abb. 14 und Abb. 15), sie waren aber auch unabhängig von einer Schwellung am Axon sichtbar. Ein dokumentiertes Axon verlief separat zwischen zwei Axonfaszikeln, bildete in seinem Verlauf mehrere Schwellungen und entließ in Höhe einer spindelförmigen Schwellung einen dornenförmigen Fortsatz (Abb. 14). Die Aufnahme stammte aus einem Versuch drei Wochen nach dem NO-*crush*. Sechs Monate nach einer intraorbitalen Quetschung des NO wurden zwei nebeneinander lokalisierte Schwellungen in der Netzhaut dokumentiert (Abb. 15). Die Dornen entsprangen aus einer spindelförmigen und einer ballonierenden Schwellung. Die Abnahme von neuronalen Strukturen war auf eine progressiv verlaufende retrograde Degeneration nach dieser langen ÜLZ zurückzuführen.



Abb. 14: BDA-markierte Nervenfasern und RGC einer geschädigten Netzhaut drei Wochen postoperativ. Die diagonal verlaufende Nervenfaser ist durch die Ausbildung eines dornenförmigen Fortsatzes charakterisiert. Er entspringt aus einer spindelförmigen Schwellung (Pfeil). Zwischen den Axonen sind schwach markierte Somata eingelagert (Sterne). Balkenlänge 5 μm .

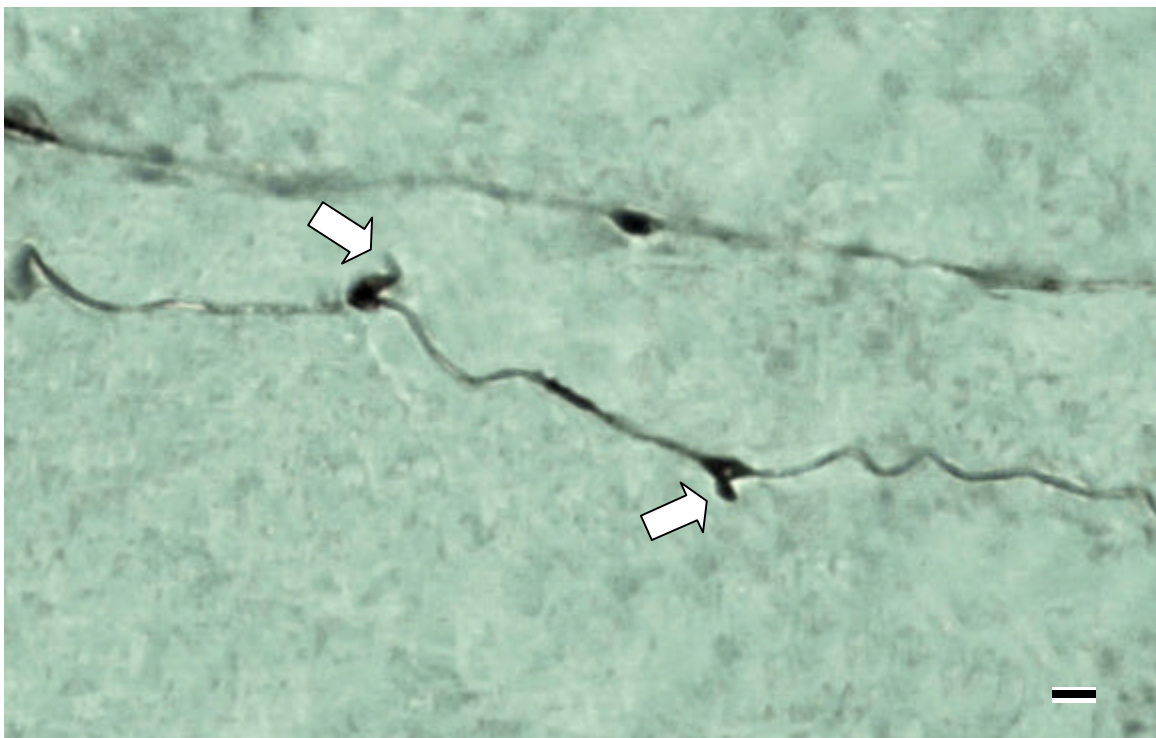


Abb. 15: Dokumentiert wurden zwei BDA-markierte Nervenfasern sechs Monate nach *NO-crush*. An der fokussierten Nervenfaser sind zwei dornenförmige Fortsätze sichtbar, die ihren Ursprung in einer Schwellung haben (Pfeile). Diese Netzhaut war durch eine progressive Verminderung neuronaler Strukturen charakterisiert. Balkenlänge: 5 μm .

4.2.3 Axonsprosse mit Wachstumskegeln

Die Darstellung von axonalen Neubildungen in Gestalt eines terminalen Endkolbens gelang in den *crush*-geschädigten Netzhäuten. Es ließen sich zu exakt definierbaren ÜLZ braun-markierte birnenförmige aberrante Fortsätze, die *axonal sprouts*, feststellen. Zu den postoperativen Zeiten von zehn Tagen (Abb. 16 und Abb. 17), zwei Wochen (Abb. 18 und Abb. 19), drei Wochen (Abb. 20 und Abb. 21) und vier Wochen (Abb. 22 und Abb. 23) konnten Axonsprosse identifiziert werden. Diese traten ab einem ÜLZ von zehn Tagen bis zu einem ÜLZ von vier Wochen in einer axotomierten Netzhaut eines adulten Tieres auf.

Die im Lichtmikroskop ermittelten Strukturen waren durch eine vergleichbare Morphologie, Lokalisation und Verlaufsrichtung charakterisiert. Sie setzten sich aus einem zuführenden axonalen Segment mit einer terminalen Auftreibung zusammen. Der mittlere Durchmesser des terminalen Endkolbens, der rundlich bis oval gestaltet erscheint, wies eine Größe von 5 bis 10 µm auf. Prädisponierte Lokalisationen waren die zentralen und mittleren Retinagebiete. Die Axonsprosse projizierten vom *Discus nervi optici* zur Netzhautperipherie. Das axonale Segment verließ in einem stumpfen oder spitzen Winkel den Faszikel und blieb in unmittelbarer Nähe zu diesem weiterhin dokumentierbar. Im Hinblick auf die rostro-kaudale Achse existierten diese Axonsprosse in der Nervenfaserver- und Ganglienzellschicht. Sie waren bis in die innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) zu verfolgen.

In den folgenden Abbildungen kennzeichnet ein eingebuchteter Richtungspfeil die räumliche Ausdehnung vom *Discus nervi optici* zur Retinaperipherie (Pfeilspitze zeigt zur Retinaperipherie).

ÜLZ zehn Tage

Zehn Tage nach einer Axotomie des Sehnervs konnten intraretinale Axonsprosse mit Wachstumskegeln festgestellt werden (Abb. 16 und Abb. 17). Ein Axonspross wurde von zwei Axonfasziken flankiert (Abb. 16). Die Struktur zog aus dem unteren Faszikel mit einem kurzen s-förmigen Verlauf in die Nähe des oberen Faszikels und endete mit einem ovoiden Wachstumskegel. Im rechten unteren Bildrand befanden sich drei spezifisch BDA-markierte Ganglienzellen und ein Blutgefäß. Der Fokus war auf den Wachstumskegel eingestellt. Das zuführende Axonsegment ist defokussiert und somit sehr undeutlich.

Eine axonale Neubildung grenzte sich klar vom umliegenden Gewebe durch ihre auffallende BDA-Markierung ab (Abb. 17). Der Axonspross mit seinem Wachstumskegel konnte von der Nervenfaserschicht (*nerve fiber layer*, NFL) über die GCL bis in die hier abgebildete IPL verfolgt werden. Das rechts gelegene Axonbündel befindet sich nicht mehr im Fokus. Der Wachstumskegel trägt zwei kurze filigrane Gebilde an seinem apikalen Pol.

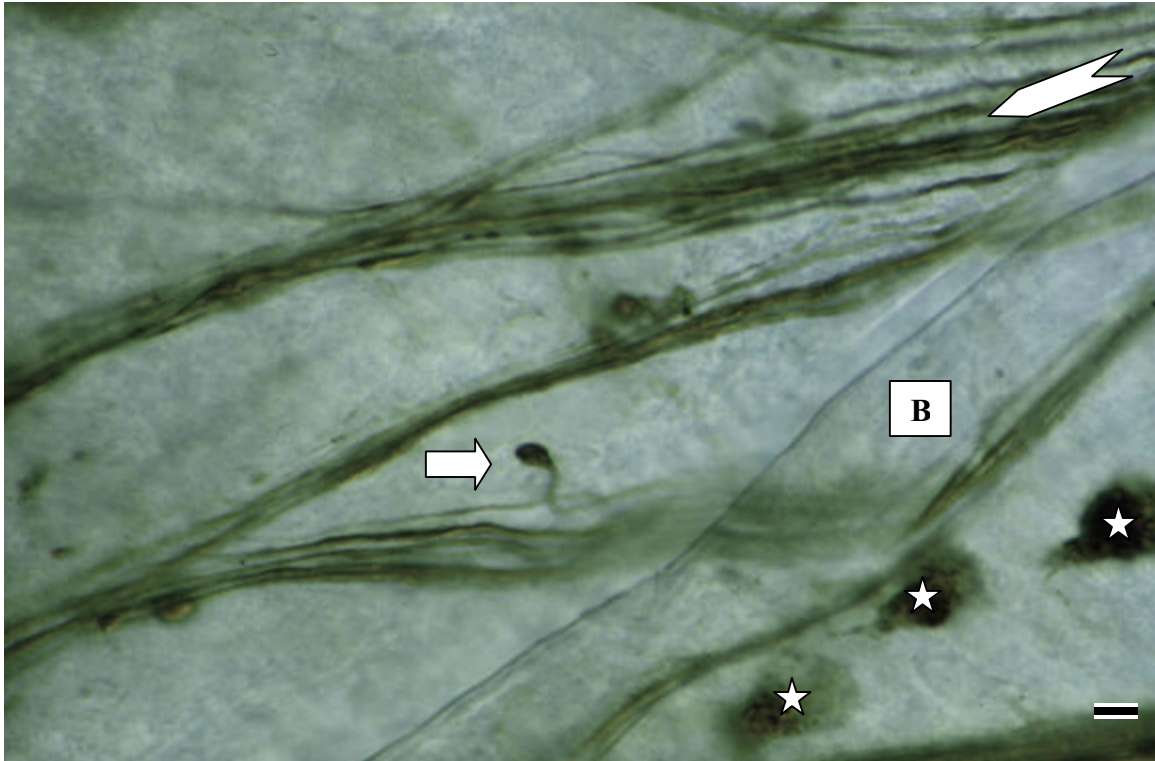


Abb. 16: BDA-markierter Axonspross mit Wachstumskegel in einer Netzhaut zehn Tage nach NO-crush. Der Axonspross mit seinem ovoiden Wachstumskegel (Pfeil) wird von zwei Axonfaszikeln und einem Blutgefäß (B) eingeschlossen. Weiterhin sind in unmittelbarer Nähe drei markierte RGC (Sterne) zu erkennen. Balkenlänge: 5 μ m.

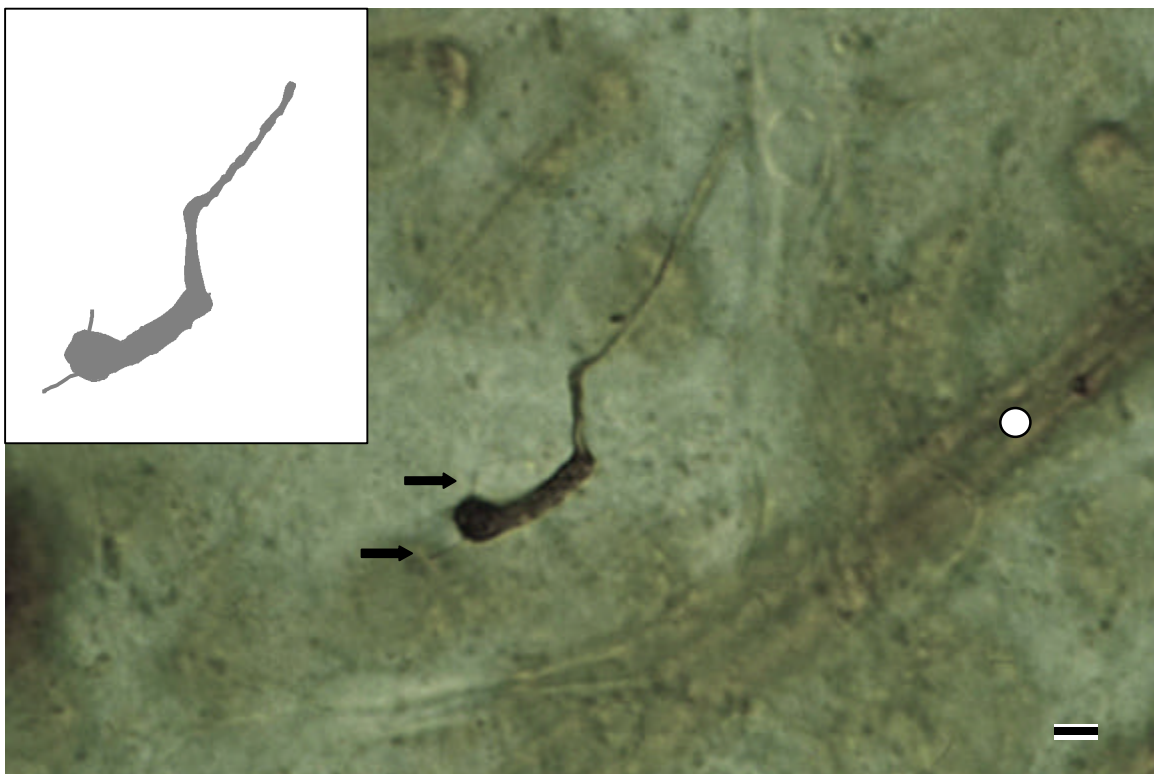


Abb. 17: BDA-markierter Axonspross mit Wachstumskegel zehn Tage nach der Axotomie. Diese aberrante Neubildung befindet sich in der IPL. Der im unteren rechten Bildrand erscheinende Axonfaszikel (Kreis) ist defokussiert. Der Wachstumskegel trägt an seinem apikalen Pol zwei filigrane Gebilde (schwarze Pfeile). Inset: grafische Rekonstruktion. EM-Befunde: siehe Abb. 35 und 36. Balkenlänge: 5 μ m.

ÜLZ zwei Wochen

Nach einer Zeitspanne von 14 Tagen zwischen der intraorbitalen Läsion und der Perfusion kam es zum Auftreten von Axonsprossen (Abb. 18 und Abb. 19). Die Morphologie der aberranten Fortsätze, ihre Lokalisation und ihre räumliche Ausdehnung im retinalen Gewebe stimmten weitestgehend mit den bereits beschriebenen Befunden der ÜLZ von zehn Tagen überein. Ein Axonspross zweigte in einem spitzen Winkel vom Axonfaszikel ab und überquerte ein intraretinales Blutgefäß (Abb. 18). Er endete in einem deutlich markierten rundlichen Wachstumskegel. Die Nervenfasern in einem Axonfaszikel zeigten spindelförmige und ballonierende Schwellungen. Ein weiterer Axonspross mit gleicher postoperativer ÜLZ besaß ebenfalls eine enge Korrelation zu Blutgefäßen und Axonfaszikeln (Abb. 19).

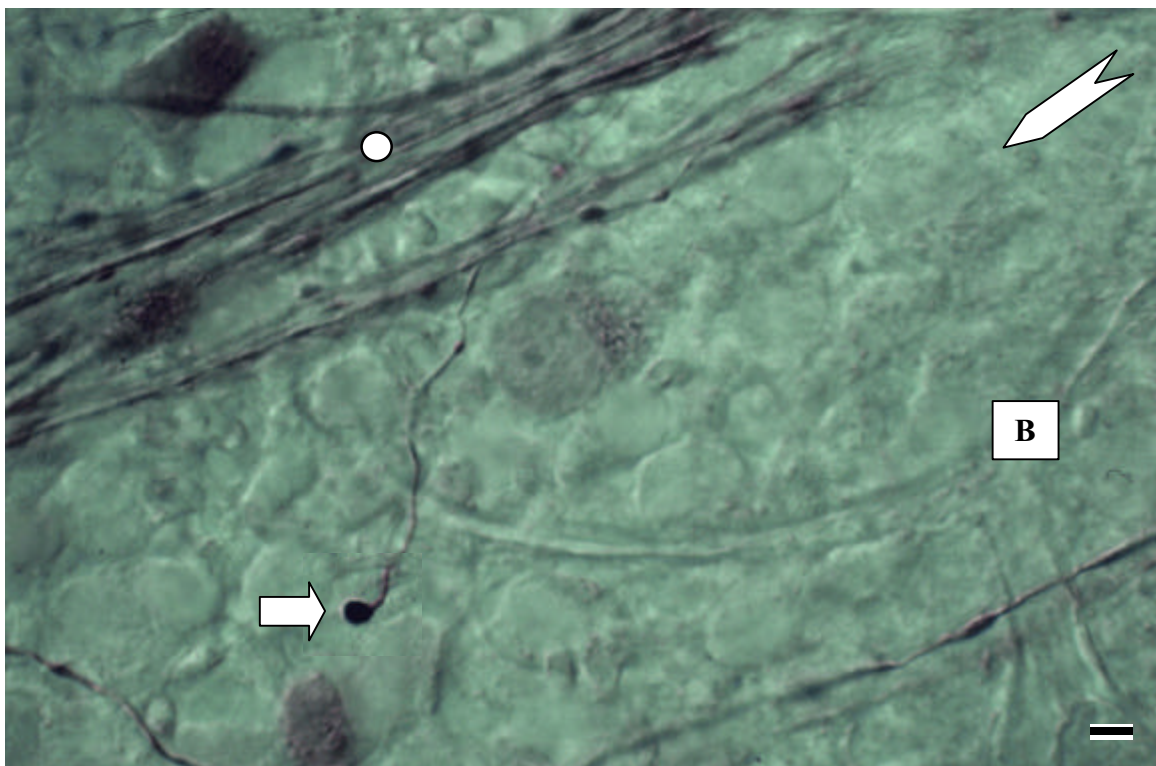


Abb. 18: BDA-markierter intraretinaler Axonspross mit Wachstumskegel. Dargestellt in einer Netzhaut nach einer postoperativen ÜLZ von zwei Wochen. Der Axonspross überquert ein intraretinales Blutgefäß (B), um in einem verdickten rundlichen Wachstumskegel zu enden (Pfeil). Der obere linke Bildrand zeigt markierte Axonfaszikel (Kreis) mit Schwellungen an den Axonen. Balkenlänge: 5 μ m.

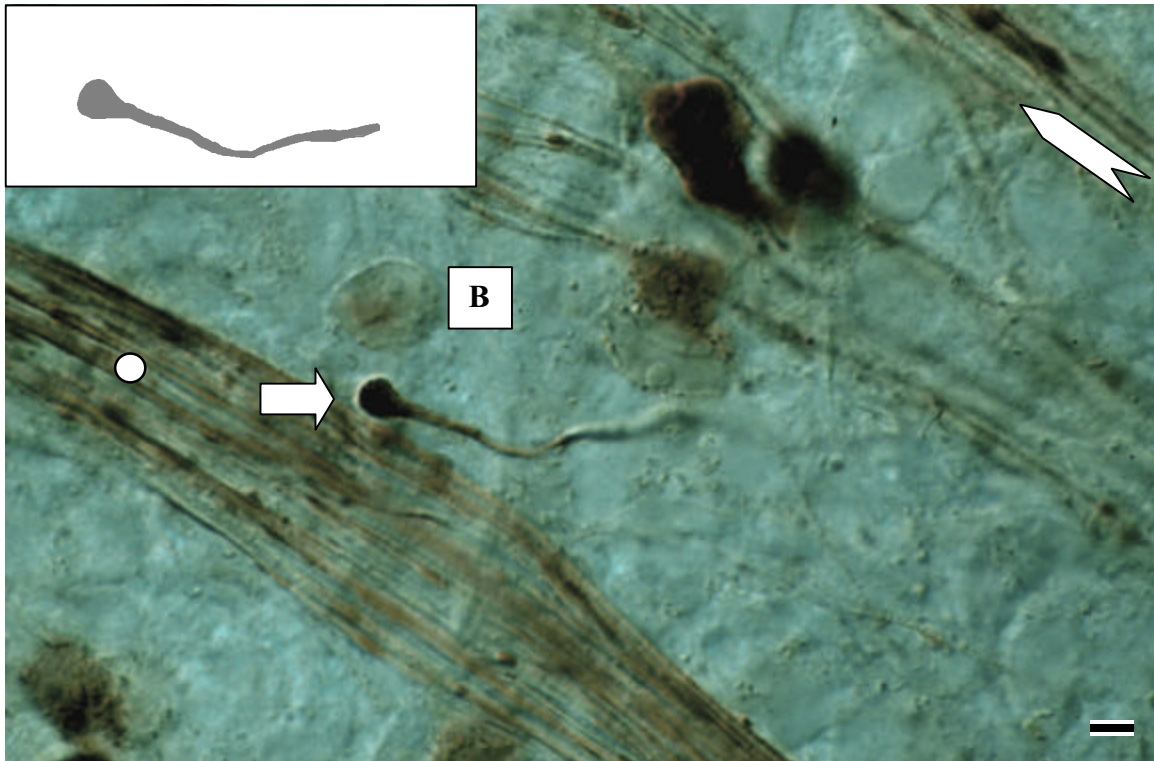


Abb. 19: BDA-markierte Netzhaut der adulten Ratte nach einer postoperativen ÜLZ von zwei Wochen. Der Wachstumskegel des Axonsprosses erscheint in enger Korrelation zu einem benachbarten Axonfaszikel (Kreis) und einem intraretinalen Blutgefäß (B). Inset: grafische Rekonstruktion. EM-Befunde: s. Abb. 37 und 38. Balkenlänge: 5 µm.

ÜLZ drei Wochen

Der lichtmikroskopische Nachweis von Wachstumskegeln drei Wochen nach einer *Nervus opticus*-Axotomie durch eine Quetschung war ebenfalls möglich. Auffallend war die recht intensive BDA-Markierung der terminalen Wachstumskegel (Abb. 20 und Abb. 21). Diese zeichneten sich durch eine ovoide Gestalt mit einer Länge von 10 µm und einer Breite von 6 µm aus. Das zuführende Axonsegment wirkte in Relation zum markanten Wachstumskegel eher feingliedrig. Diese Merkmale verliehen den Axonsprossen eine recht charakteristische Gestalt.

Abb. 20: BDA-markierter Axonspross mit einem Wachstumskegel drei Wochen nach einer intraorbitalen Quetschung des *Nervus opticus*. Auffallend ist der sehr große ovoide, deutlich markierte Wachstumskegel, der von einem feingliedrigen Axonsegment getragen wird. Balkenlänge: 10 μm .

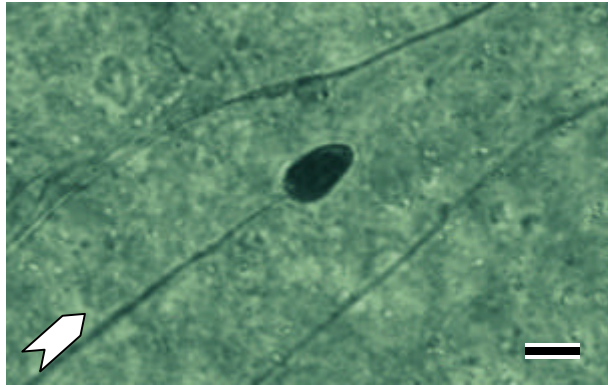
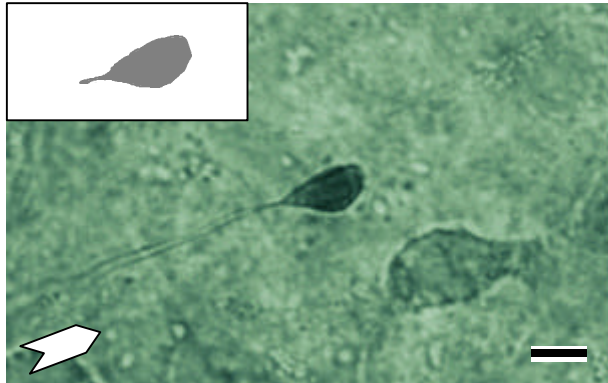


Abb. 21: BDA-markierter Axonspross drei Wochen nach Axotomie des Sehnervs. Auch hier ein bemerkenswert großer ovoider stark markierter Wachstumskegel mit einem schlanken zuführenden Axonsegment. Inset: grafische Rekonstruktion. EM-Befunde: s. Abb. 39 und 40. Balkenlänge: 10 μm .



ÜLZ vier Wochen

In einer axotomierten Netzhaut vier Wochen nach der intraorbitalen Schädigung waren ebenfalls intraretinale Wachstumskegel zu erkennen (Abb. 22 und Abb. 23). Das zuführende Axonsegment wurde in seinem Verlauf dicker, bis es schließlich in einem kleinen ovoiden Wachstumskegel endete (Abb. 22). Der Wachstumskegel verlief parallel zu einer benachbarten Nervenfaser. Unter dem Axonsegment konnte eine Typ-I-RGC mit drei Dendritenabgängen dokumentiert werden. In einem zweiten Versuchsansatz gleicher postoperativer ÜLZ war der Axonspross mit seinem länglich ovoiden Wachstumskegel in enger Korrelation zu einem nahe gelegenen Axonfaszikel und einem Blutgefäß sichtbar (Abb. 23).

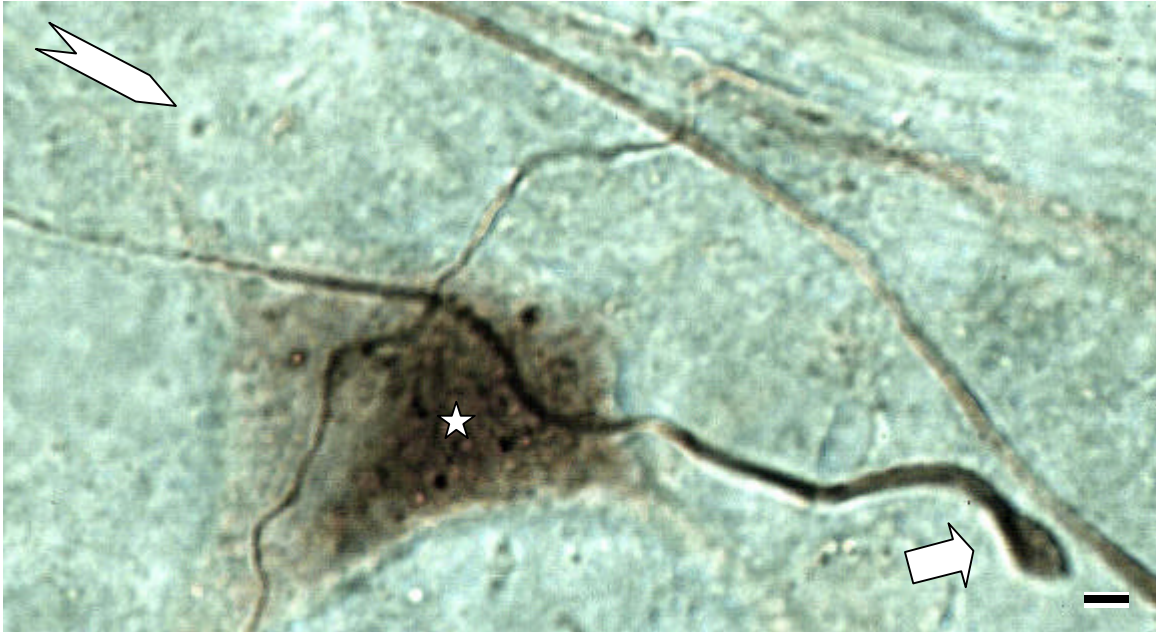


Abb. 22: Intraretinaler Axonspross mit einem Wachstumskegel nach einer postoperativen ÜLZ von vier Wochen. Der kleine ovoide Wachstumskegel (Pfeil) erstreckt sich parallel zu einer benachbarten Nervenfasern. Ein separat verlaufendes Axon kreuzt in der Bildmitte das zuführende Axonsegment. Die darunter befindliche Typ-I-RGC (Stern) mit ihren drei Dendritenabgängen ist nur schwach mit BDA markiert. Balkenlänge: 5 μm .

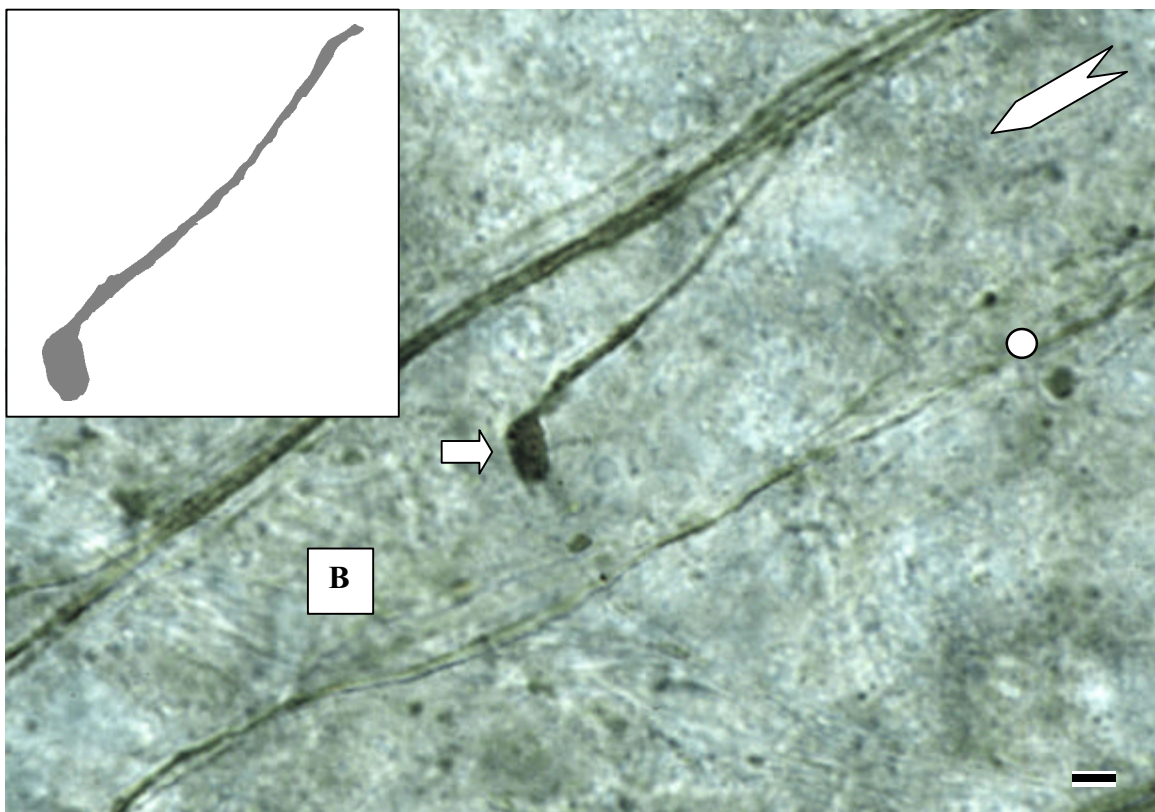


Abb. 23: BDA-markierter Axonspross mit einem Wachstumskegel vier Wochen nach intraorbitalem NO-crush. Das in einem spitzen Winkel aus dem Faszikel hervortretende Axonsegment geht in einen länglich ovoiden Wachstumskegel (Pfeil) über. In unmittelbarer Nähe des Wachstumskegels befinden sich ein Axonfaszikel (Kreis) mit zwei bis drei Axonen und ein intraretinales Blutgefäß (B). Dieser Wachstumskegel wird unter Abschnitt 4.4 in einer ultrastrukturellen Schnittbildserie gezeigt. Inset: grafische Rekonstruktion. EM-Befunde: siehe Abb. 41. Balkenlänge: 5 μm .

Zusammenfassung der Befunde zu den analysierten Wachstumskegeln

- Die Wachstumskegel zeigten eine ähnliche Morphologie.
- Die Wachstumskegel waren durch ca. 5 bis 10 μm große rundliche bis ovoide Endkolben charakterisiert.
- Die Wachstumskegel zeigten vorwiegend eine einheitliche Verlaufsrichtung vom *Discus nervi optici* zur Netzhautperipherie.
- Die Wachstumskegel gingen aus einem Hauptfaszikel hervor.
- Die Wachstumskegel existierten in enger Korrelation zu Blutgefäßen und benachbarten Axonen.
- Die Wachstumskegel traten in einem Zeitraum von zehn Tagen bis vier Wochen nach der Quetschung auf.

4.2.4 Axonkollateralen

Nach einer Quetschung des NO der adulten Ratte konnten auf lichtmikroskopischer Ebene intraretinale Axonkollateralen dokumentiert werden. Diese Aufzweigungen an den BDA-markierten Axonen waren zu den postoperativen ÜLZ von zwei, drei und acht Wochen sichtbar. Sehr deutlich ausgeprägte Axonkollateralen konnten zwei und drei Wochen nach Läsion analysiert werden. Häufig entsprangen sie aus einem Axon in einem Faszikel und zogen in ihrem erratischen Verlauf der IPL zu. Ihre Terminationsstruktur entspricht einem Endkolben mit unregelmäßigem Bau. Bevorzugt waren sie im zentralen Retinagebiet anzutreffen. Die Zuordnung einer Axonkollateralen zur Ursprungszelle war nur in einem Fall eindeutig, da die Aufzweigung unmittelbar hinter dem Axonhügel lokalisiert war.

Die Axonkollateralen wurden so klassifiziert:

- Axonkollaterale (Axonkollaterale erster Ordnung)

Axonaler Fortsatz, der eindeutig aus einem retinalen Axon abzweigte und länger als 5 μm war. Die Grundlage dieses Abzweigs konnte eine Schwellung sein. Sie endete in der IPL in einer komplexen Struktur.

- Kollateralzweige (Axonkollaterale zweiter Ordnung)

Alle Fortsätze einer Axonkollaterale erster Ordnung, die länger als 5 μm waren. Sie konnten aus einer Schwellung hervorgehen und endeten in einer komplexen Struktur.

ÜLZ zwei Wochen

Zwei Wochen nach intraorbitaler Läsion konnten in zwei Versuchsansätzen intraretinale Axonkollaterale gefunden werden. Um die Axonkollaterale in ihrem gesamten Ausmaß erfassen zu können, wurde eine grafische Rekonstruktion angefertigt (Abb. 24).

Sie entsprangen aus einem Faszikel in unmittelbarer Nähe des *Discus nervi optici* (Abb. 24). Die Abbildung kennzeichnet die axonalen Abzweige, die gebildeten Kollateralzweige des weiteren erratischen Verlaufs und die Terminationsstrukturen. Die Axonkollaterale entsprangen innerhalb eines Axonfaszikel. Ob es sich um die gleiche Nervenfaser handelte, konnte aufgrund der schwierigen Differenzierung von Einzelaxonen in einem Faszikel nicht eindeutig bestimmt werden. An der kurzen Kollaterale waren Schwellungen und dornenförmige Fortsätze sichtbar. Sie endete in einer keine eindeutigen Merkmale aufweisenden Struktur in der NFL (Abb. 25). Die lange Kollaterale zeigte einen hohen Grad an morphologischer Variabilität (Abb. 25 bis Abb. 29). Sie bildete auf ihrem Weg in die IPL vier starke Kollateralzweige, die in ein großflächiges Netzhautareal zogen. In ihrem Verlauf konnten Schwellungen festgestellt werden. Die Axonkollaterale und ihre Kollateralzweige endeten mit komplexen Strukturen in der IPL. In der Ganglienzellschicht war eine Typ-I-RGC mit ihrem Soma und einem Dendritenanteil sichtbar (Abb. 27 und Abb. 28). Diese RGC erschien strukturell unverändert.

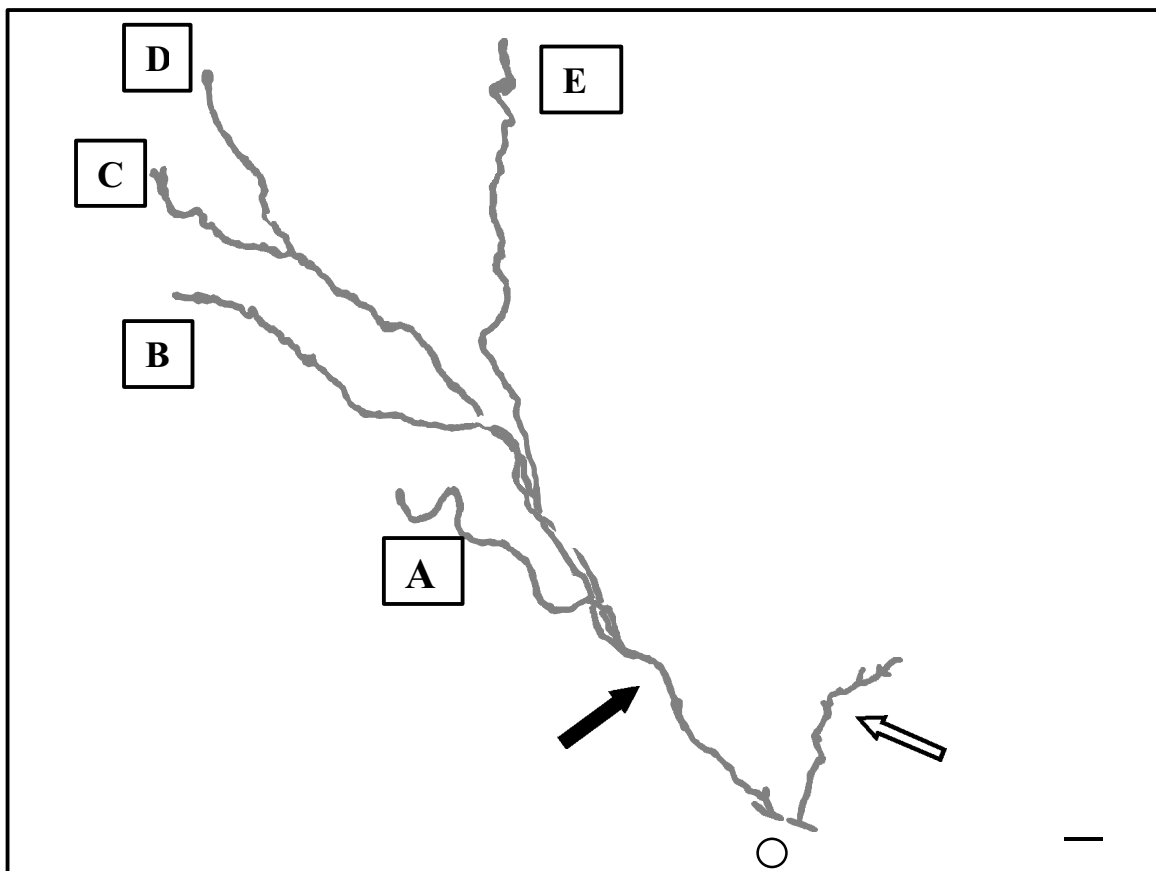


Abb. 24: Grafische Rekonstruktion zweier intraretinaler Axonkollateralen. Zwei Kollateralen, eine kurze Kollaterale (weißer Pfeil) und eine lange Kollaterale (schwarzer Pfeil), wurden nach einer zweiwöchigen ÜLZ in einer gequetschten Netzhaut gefunden. Sie entspringen aus einer Nervenfaser in einem Axonfaszikel (Kreis). Die große Kollaterale gabelt sich in ihrem weiteren Verlauf in vier Kollateralzweige auf und die Gesamtstruktur endet mit fünf Terminationen in der IPL (A – E; siehe Abb. 25 bis Abb. 29); Balkenlänge: 25 µm.

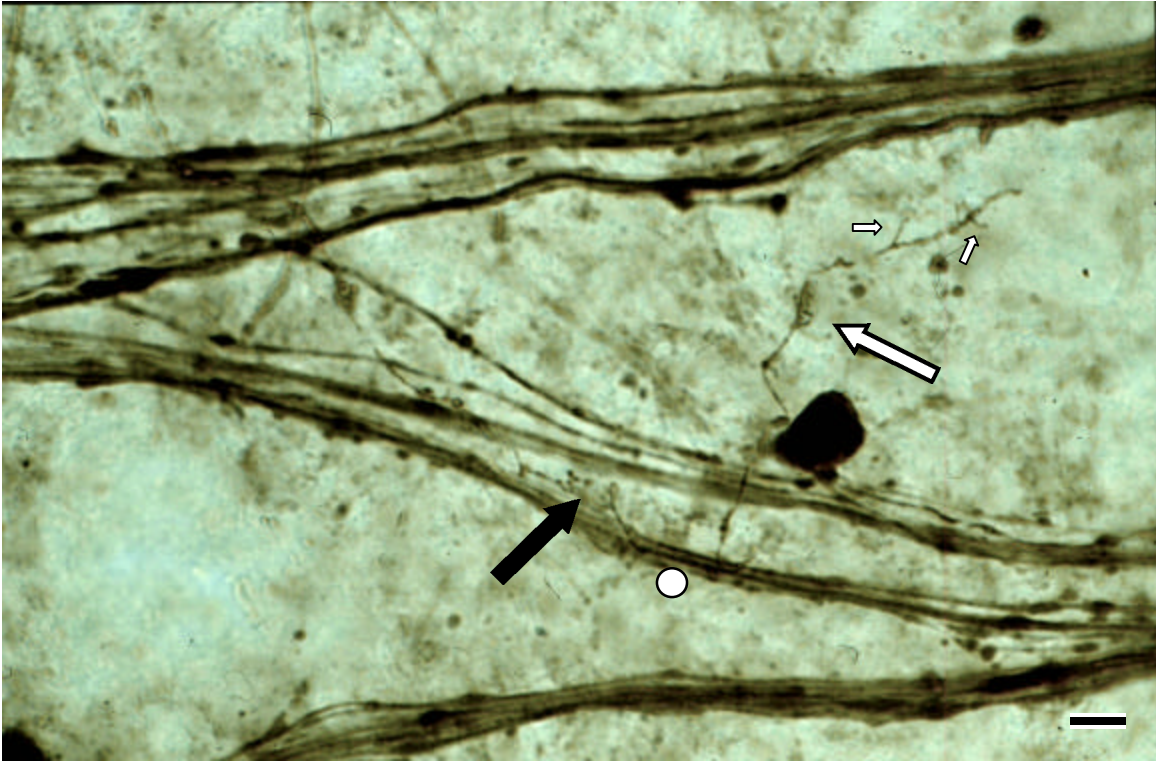


Abb. 25: BDA-markierte Netzhaut zwei Wochen nach einem intraorbitalen *crush* des *Nervus opticus*. Sichtbar sind zwei Abzweige intraretinaler Axonkollateralen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Axonfaszikel (Kreis). Die kurze Kollaterale (weißer Pfeil) zweigt rechtwinkelig aus einer Nervenfasern ab und zieht mit einem kurvenartigen Verlauf in die Nähe eines benachbarten Faszikels. Sie ist durch das Auftreten zweier dornenförmiger Fortsätze (kleine weiße Pfeile) charakterisiert. Der Abzweig der langen Kollaterale (schwarzer Pfeil) ist stumpfwinkelig. Sie zieht in die IPL. Balkenlänge: 10 μm .

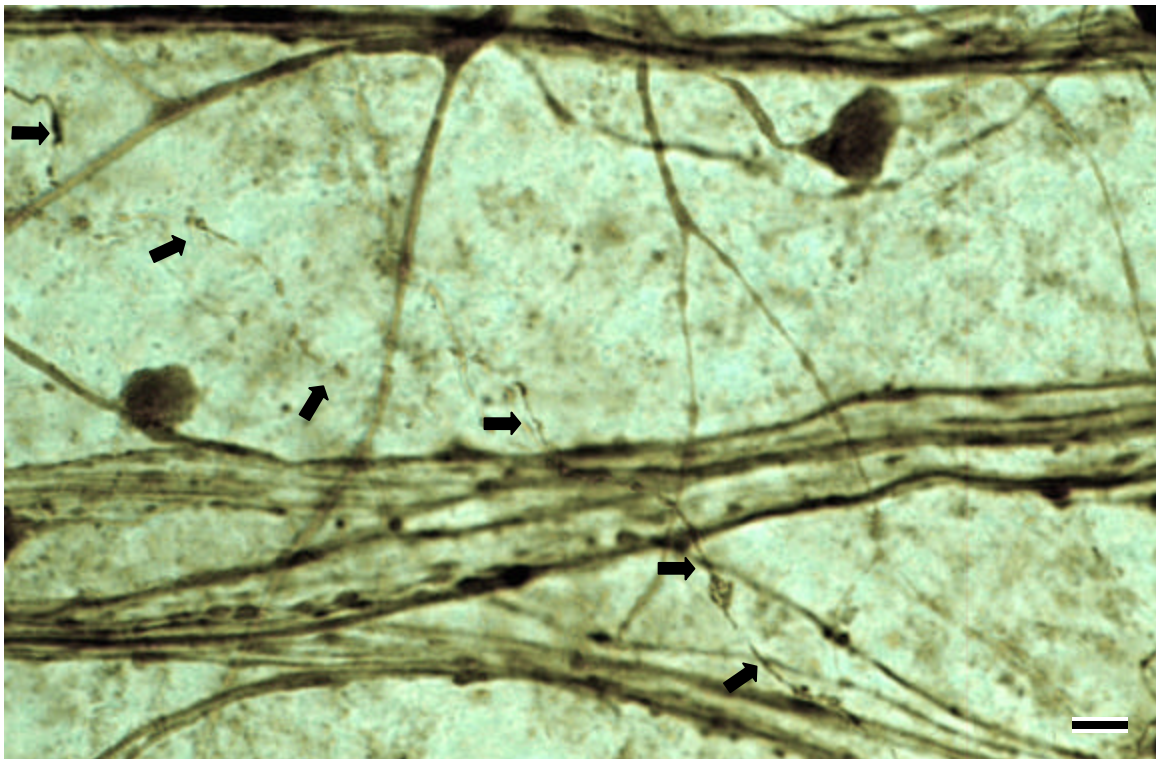


Abb. 26: BDA-markierte intraretinale Axonkollaterale zwei Wochen nach der Läsion des *Nervus opticus*. Darstellung des erratischen Verlaufs der langen Kollaterale (schwarze Pfeile). Balkenlänge: 10 μm .

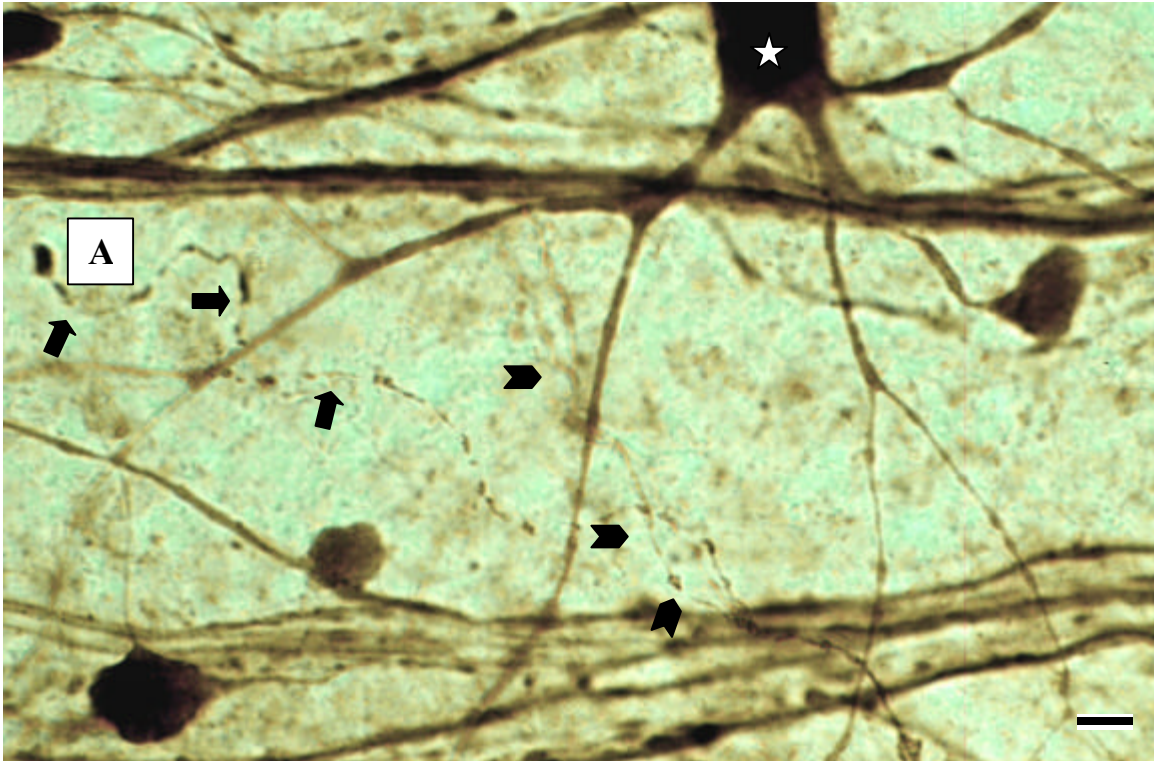


Abb. 27: BDA-markierte intraretinale Axonkollaterale zwei Wochen nach einer *Nervus opticus*-Quetschung. Aus der langen Axonkollaterale (eingebuchtete Richtungspfeile) zweigt sich die erste Endstruktur ab (A siehe Abb. 24) (Pfeile) und endet mit einer halbrunden Struktur (linker mittlerer Bildrand). Unweit der Axonkollaterale befindet sich eine Typ-I-RGC (Stern) in der GCL. Sie erscheint morphologisch unverändert. Balkenlänge: 10 μ m.

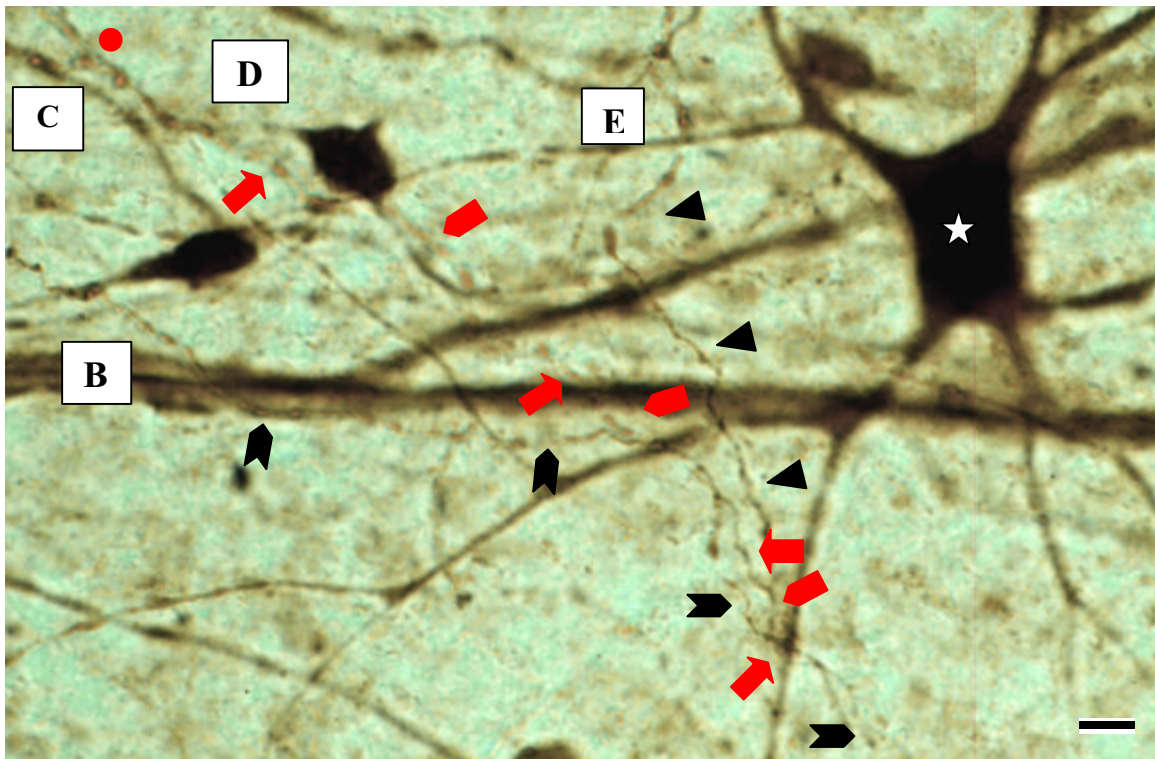


Abb. 28: BDA-markierte Axonkollaterale zwei Wochen nach Läsion. Es kommt im Bereich zwischen der GCL und der IPL (Typ-I-RGC [Stern] befindet sich nicht mehr im Fokus) zu einer starken Aufzweigung in die Endstrukturen **B** (schwarze Richtungspfeile), **C** und **D** (rote Pfeile und Richtungspfeile) sowie **E** (schwarze Pfeilköpfe). Die Verzweigung in die Endstrukturen **C** und **D** ist im linken oberen Bildrand sichtbar (roter Kreis). Balkenlänge: 10 μ m.

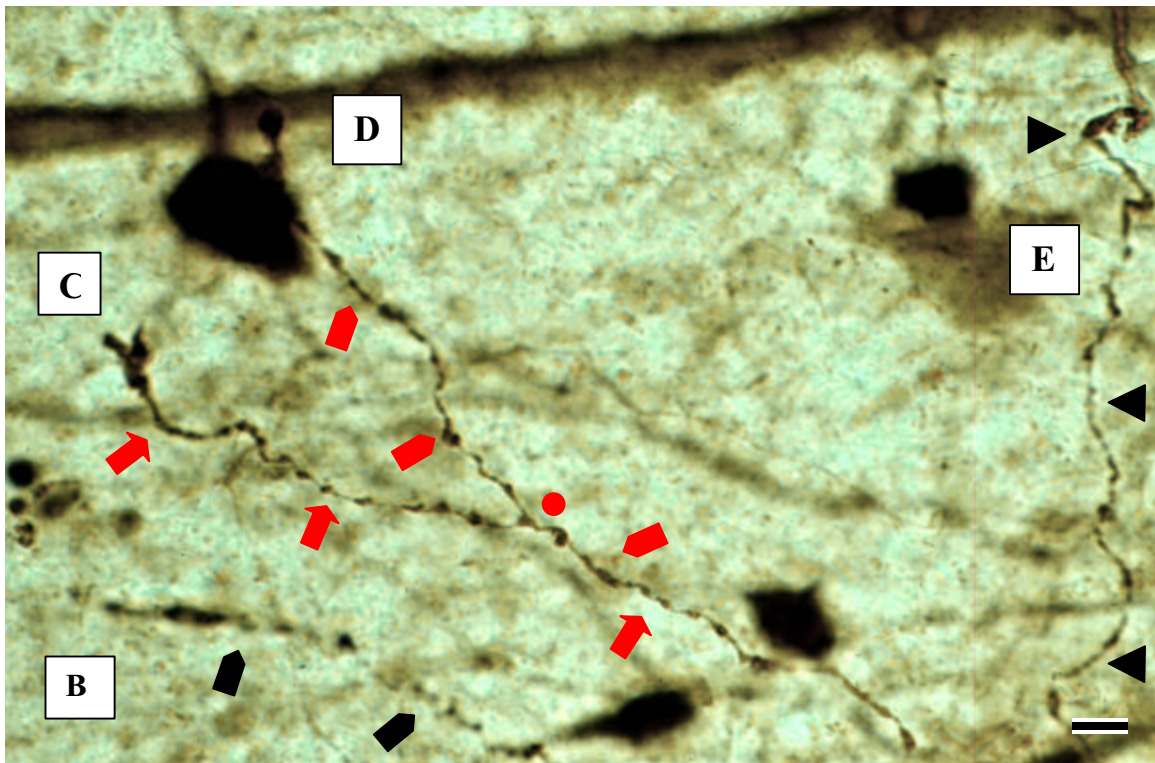
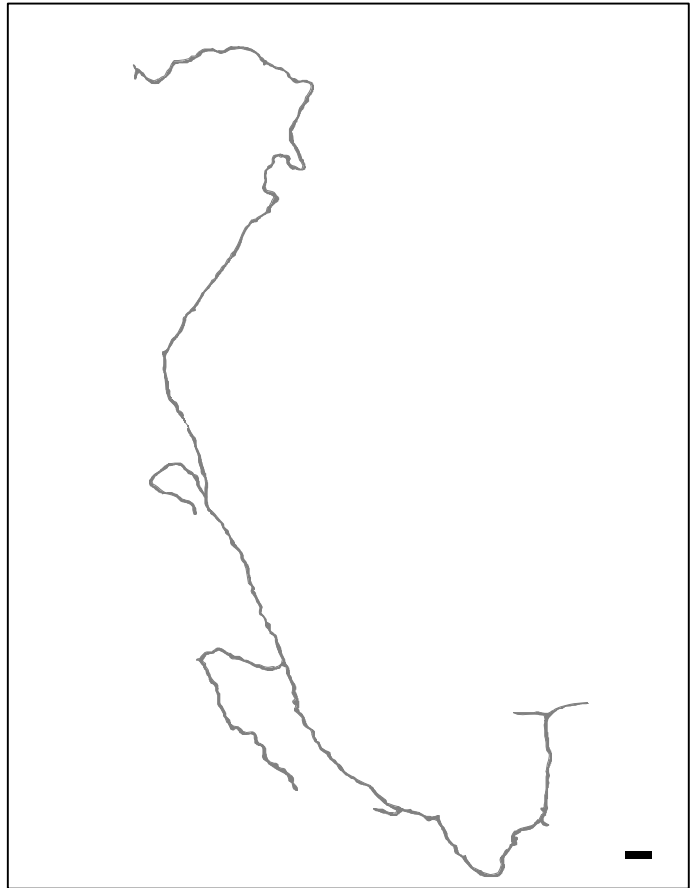


Abb. 29: BDA-markierte intraretinale Axonkollaterale zwei Wochen nach NO-Crush. Darstellung der Endstrukturen der Axonkollaterale und ihrer Kollateralzweige. Die Endstruktur **B** (schwarze Richtungspfeile) erscheint in einer länglichen Gestalt, die hier defokussiert ist. In der Bildmitte gabelt sich die Gesamtstruktur in zwei kurze Verzweigungen auf (roter Kreis). Die Endstruktur **C** (rote Pfeile) endet in einer v-förmigen und die Endstruktur **D** (rote Richtungspfeile) in einer runden Gestalt. Die Endstruktur **E** (schwarze Pfeilköpfe) zeigt eine stark gelappte Morphologie. Die Lokalisation der IPL ist an den defokussierten RGC und am filigranen Netzwerk (höhere Dendritenordnungen der RGC) zwischen den markierten Anteilen erkennbar. Balkenlänge: 10 µm.

Die intraretinale Axonkollaterale aus dem zweiten Versuchsansatz wurde mittels einer grafischen Rekonstruktion dargestellt (Abb. 30). Sie entsprang aus einem Faszikel in unmittelbarer Nähe des *Discus nervi optici*. Die Rekonstruktion zeigt den axonalen Abzweig, im weiteren Verlauf die gebildeten Kollateralzweige und das unscheinbar wirkende Ende. Die Kollaterale entsprang aus einer ballonierenden Schwellung innerhalb eines Axonfaszikels. Im weiteren Verlauf kam es zur Bildung von Schwellungen, dornenförmigen Fortsätzen und drei Kollateralzweigen. Die Kollaterale war auf latero-lateraler Ebene in Richtung *Discus nervi optici* zu verfolgen. Sie endete in der IPL.

Abb. 30: Grafische Rekonstruktion einer intraretinalen Axonkollaterale und ihrer Kollateralzweige. Diese Axonkollaterale konnte in einer Netzhaut zwei Wochen nach einem intraorbitalen *NO-crush* dokumentiert werden. Sie entsprang aus einer Schwellung in der NFL und endete in der IPL. In ihrem Verlauf bildete sie Schwellungen, dornenförmige Fortsätze und drei Kollateralzweige aus. Balkenlänge: 10 μm .



ÜLZ drei Wochen

Drei Wochen nach Quetschung des Sehnervs 5 mm hinter dem Bulbus konnte eine BDA-markierte Axonkollaterale nachgewiesen werden (Abb. 31). Sie war im Bereich einer Typ-III-RGC lokalisiert. Typ-III-Ganglienzellen zeichnen sich durch ein mittelgroßes Soma mit einem großen dendritischen Feld aus. Die Größe des dendritischen Feldes ist auf die Länge der Dendriten und nicht auf die Verzweigungsfrequenz zurückzuführen. In einem Abstand von 10 μm vom Axonhügel wurde eine im Durchmesser auf die Hälfte des Ursprungsassons reduzierte Axonkollaterale gefunden. Die Axonkollaterale beendete mit einer gleichbleibenden Kontur ihren kurzen geraden und glatten Verlauf. Sie besaß eine Länge von ungefähr 20 μm . Das Axon der Typ-III-RGC verlief geradlinig einem Faszikel zu. Die Dendriten sind bei dem gewählten Fokus nicht abgebildet. Um die Ganglienzelle in ihrem gesamten Ausmaß darzustellen, wurde eine grafische Rekonstruktion angefertigt (Abb. 32).

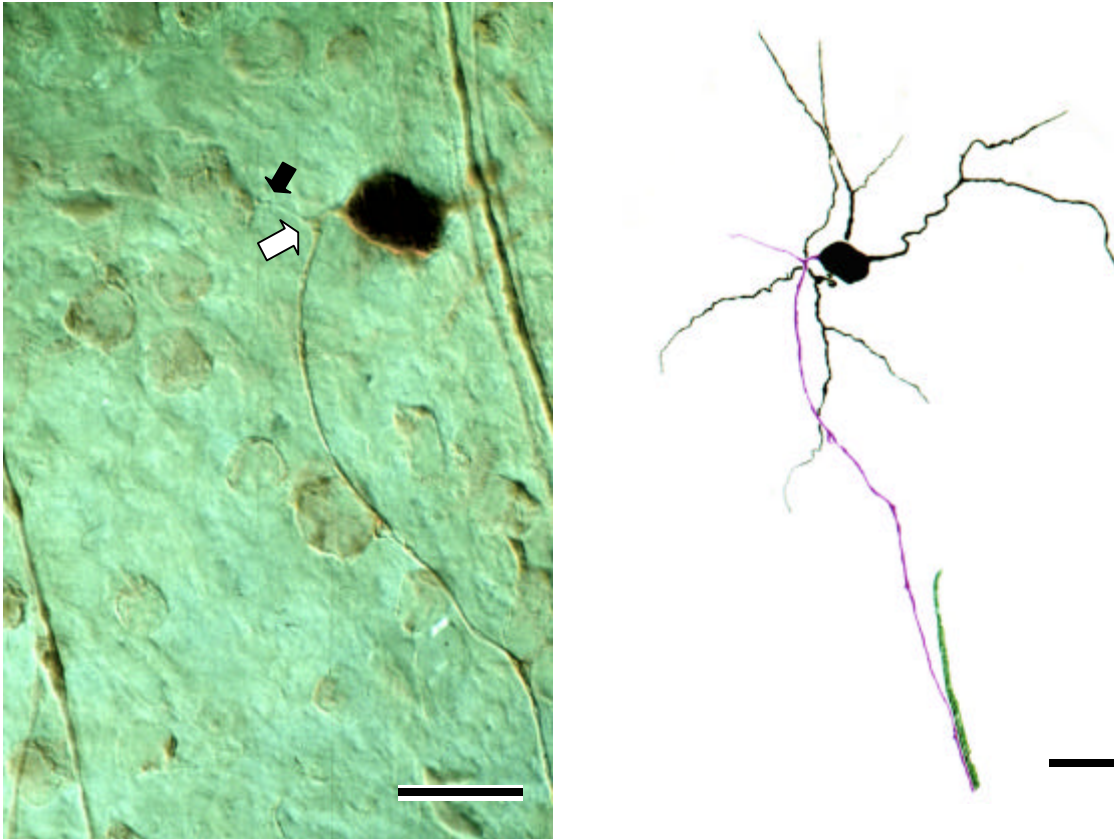


Abb. 31 und 32: Intraretinale Axonkollaterale in der Netzhaut nach einer postoperativen ÜLZ von drei Wochen. Eine Typ-III-RGC gabelt sich im Abstand von 10 µm vom Axonhügel (weißer Pfeil) in eine kurze Axonkollaterale (schwarzer Pfeil) auf. Ihre Länge beträgt ca. 20 µm. Das Ursprungsaxon läuft geradlinig zu einem Axonfaszikel. In der **Abb. 32** wird die Typ-III-RGC mit der axonalen Kollateralisierung und dem gesamten Dendritenbaum der Ganglienzelle grafisch dargestellt. Balkenlängen: 25 µm.

ÜLZ acht Wochen

Nach längeren ÜLZ konnte ebenfalls eine axonale Kollateralisierung nachgewiesen werden. Die progressive retrograde Degeneration war Ursache der deutlichen Abnahme neuronaler Strukturen nach achtwöchiger ÜLZ. Die BDA-Markierung erschien schwach, die Kollateralisierung undeutlich. Das Axon gabelte sich in zwei Anteile auf, die sich in einem Winkel von 180° voneinander entfernten.

4.2.5 Schleifenaxone

Die erste Form eines schleifenförmigen Axons wurde in einem Versuchsansatz zwei Wochen nach einem intraorbitalen NO-crush dokumentiert (Abb. 33). Die axonale Komponente befand sich im zentralen Netzhautgebiet. Ihr charakteristisches Merkmal war die Bildung von Kurven und Schleifen in einem zirkulären Verlauf. Nach dem Erscheinen von klar abgrenzbaren Schwellungen endete das Axon in einer länglichen Struktur. In der Nähe lagen zwei spezifisch markierte RGC.

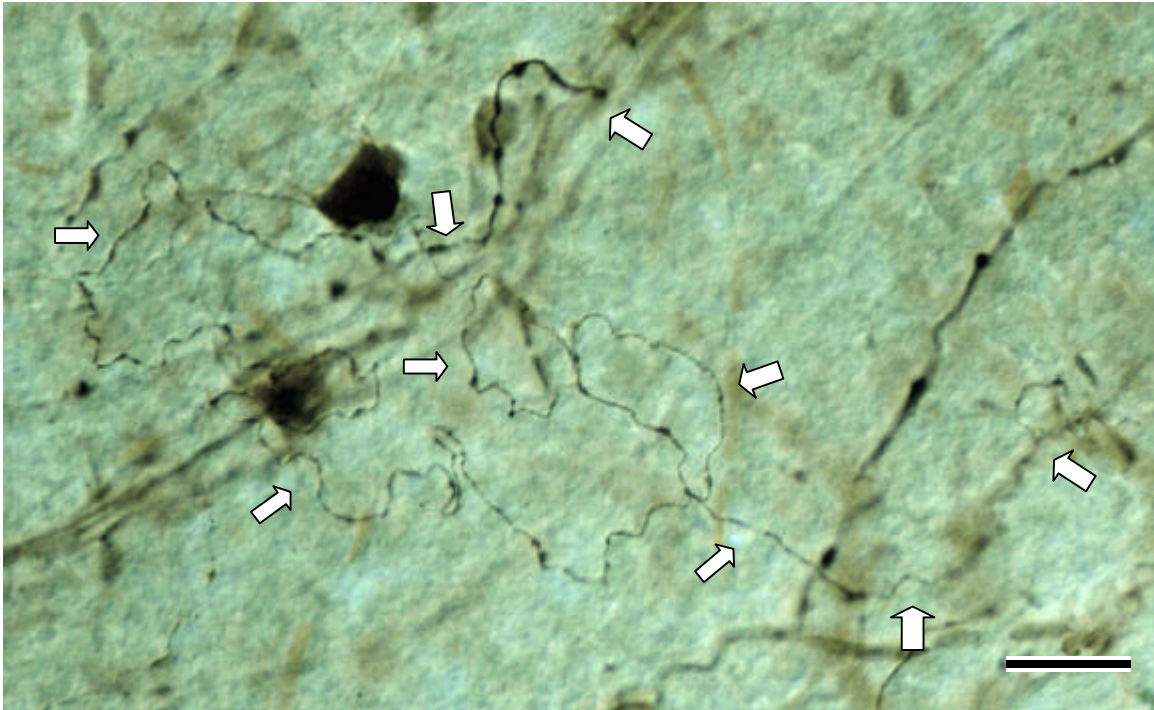


Abb. 33: BDA-markiertes „schleifenförmiges“ Axon in einer geschädigten Netzhaut zwei Wochen nach Läsion. Das Axon geht aus einem Faszikel hervor (ohne Abzweigung) und bildet in seinem weiteren Verlauf (Pfeile) mehrere Kurven und Schleifen. In der Bildmitte ist eine Doppelschleife zu erkennen. Das Schleifenaxon endet mit einer deutlich markierten länglichen Struktur zwischen der NFL und der GCL. Balkenlänge: 25 μ m.

Ein weiterer aberranter Verlauf eines Axons mit charakteristischer Schleifenbildung konnte in einer Netzhaut drei Wochen postoperativ dargestellt werden (Abb. 34). Das Axon verließ einen Faszikel ohne Kollateralisierung. Es trat aus einem Faszikel rechtwinkelig aus, bildete zwei Kurven, zog in die Nähe eines zweiten Faszikels und bog um 180° um. In seinem weiteren irregulären Verlauf bildete es erneut einige Kurven, um sich dann einem Faszikel anzugliedern, mit dem es dann die *Lamina cribosa sclerae* passierte. Am Axon konnten große und kompakte Schwellungen beobachtet werden. Sie traten in vermehrter Anzahl auf und entsprechen den Schwellungen vom breitbasig polypösen Typ. BDA-markierte Axone und Ganglienzellen beherrschten die nähere Umgebung.

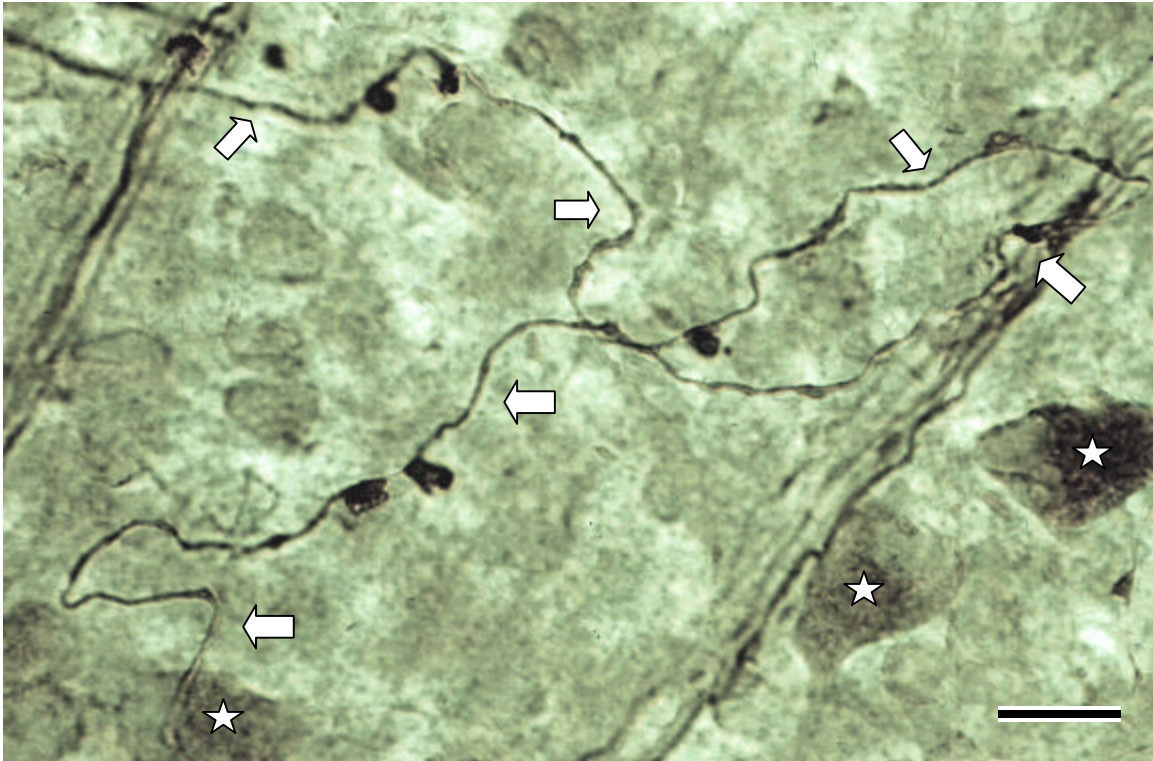


Abb. 34: BDA-markiertes Schleifenaxon in einer Netzhaut drei Wochen nach Läsion. Ein markiertes Axon (Pfeile) zieht von einem Faszikel unter starker Kurven- und Schleifenbildung in einen anderen Faszikel. In seinem irregulären Verlauf bildet es breitbasig polypöse Schwellungen aus. In unmittelbarer Nachbarschaft befinden sich drei RGC (Sterne). Balkenlänge: 25 μm .

4.3 Elektronenmikroskopische Befunde der axotomierten Netzhaut

Die intraretinalen Axonsprosse mit ihren Wachstumskegeln wurden nach einem aufwendigen Dokumentationsverfahren ultrastrukturell untersucht. Zur Bestimmung der detaillierten Lokalisation der winzigen Neubildungen im retinalen Gewebe diente eine an das Mikroskop gekoppelte digitale Kamera. Die Ultrastrukturanalyse war zur Verifizierung der lichtmikroskopisch ermittelten Befunde notwendig. Die Untersuchung aller Schnitte auf den Slot Grids ermöglichte das Aufzeigen der morphologischen Gesamtheit der aberranten Strukturen in ihrer räumlichen Ausdehnung.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen axonale Fortsätze mit terminalen Wachstumskegeln. Diese Befunde konnten nach ÜLZ von zehn Tagen (Abb. 35 und Abb. 36), zwei Wochen (Abb. 37 und Abb. 38), drei Wochen (Abb. 39 und Abb. 40) und vier Wochen (Abb. 41, Schnittbildfolge unter Abschnitt 4.4) in der geschädigten Netzhaut dokumentiert werden. Die korrespondierenden lichtmikroskopischen Befunde wurden bereits eingehend unter Abschnitt 4.2 beschrieben. Die spezifisch BDA-markierten Strukturen der intraretinalen Axonsprosse mit ihren

Wachstumskegeln waren durch elektronendichtes DAB-Präzipitat charakterisiert. Im zuführenden Axonsegment konnte eine streifenförmige Organisation des DAB-Präzipitates festgestellt werden (Abb. 36). Sie ist charakteristisches Merkmal von Axonen. Das DAB-Präzipitat füllte den axoplasmatischen Raum zwischen den Anteilen der axonalen Mikrotubuli und Neurofilamente aus. Die angedeutete Längsstreifung entstand durch die Orientierung der zytoskelettalen Strukturen in der Nervenfasern. Der Wachstumskegel war ebenfalls elektronendicht markiert. Das DAB-Präzipitat füllte das gesamte Axoplasma des Wachstumskegels aus. Es dominierte eine gitterartige Anordnung des DAB-Präzipitates im Wachstumskegel. Der Wachstumskegel wurde von einer Doppelmembran umschlossen, die in den ultrastrukturellen Aufnahmen als markante Doppelschichtung zu erkennen war (Abb. 39).

Die Ultrastrukturanalyse der intraretinalen Wachstumskegel erlaubte eine umfassende Dokumentation der zellulären Ausstattung. Die Innenarchitektur wurde insbesondere von Mitochondrien und GCV gebildet. Die Wachstumskegel enthielten Mitochondrien und GCV in unterschiedlicher Menge. Die Anzahl der tubulären und vesikulären Innenstrukturen waren in den ÜLZ von zehn Tagen (Abb. 35 und Abb. 36) und vier Wochen (Abb. 41) besonders groß, wobei ihr Gehalt bei den zwei- und dreiwöchigen Versuchsansätzen wesentlich geringer erschien (Abb. 37 bis Abb. 40). Die Mitochondrien konnten von den GCV durch ihre ovoid bis längliche Gestalt, ihre Größe, ihre Doppelmembran und ihre Innenstruktur (transversal oder schräg verlaufende Cristae, Intercristae-Raum, zentrale Matrix) unterschieden werden (Abb. 38). Die GCV besaßen als äußere Umhüllung nur eine einfache Membran und erschienen innen nicht strukturiert. Sie waren zum Teil leer oder enthielten einen amorphen Inhalt (Abb. 37). Die GCV variierten in ihrer Gestalt und Größe, da sie durch Entwässerung und Fixierung stark beeinflusst werden können. Ein auffälliger Befund der ÜLZ von zehn Tagen war das Auftreten von filigranen Strukturen.

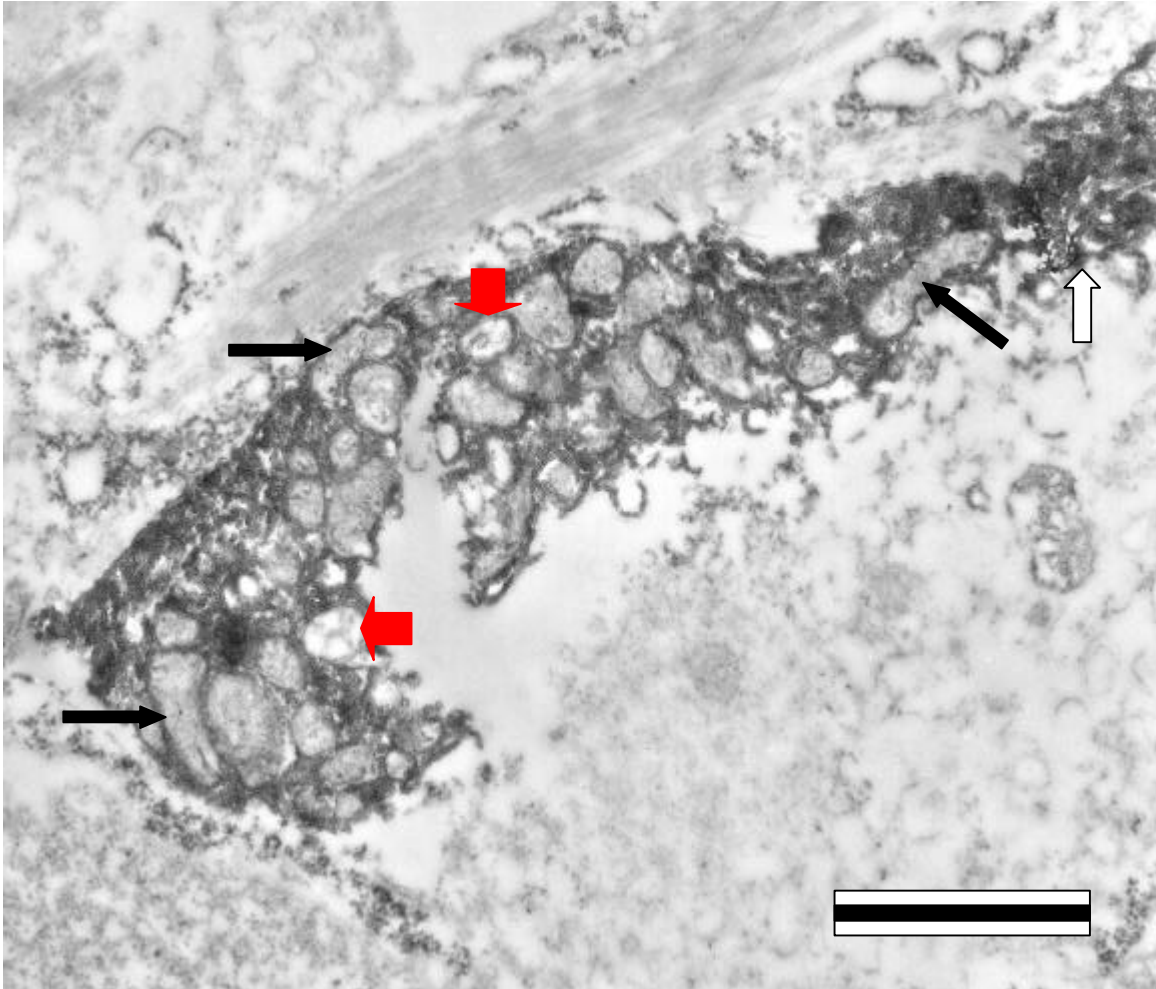


Abb. 35: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines intraretinalen Axonsprosses mit Wachstumskegel zehn Tage nach einer Quetschung des *Nervus opticus*. Bei dieser Aufnahme handelt es sich um den Befund der Abb. 17. Elektronendichtes DAB-Präzipitat füllt den gesamten axoplasmatischen Raum des zuführenden Axonsegmentes (weißer Pfeil) und des Wachstumskegels aus. Dazwischen sind zahlreiche Mitochondrien (schwarzer Pfeil) und GCV (roter Pfeil) eingelagert. Der Schnitt zeigt eine unregelmäßige Oberfläche des Wachstumskegels durch starke Lappung der Außenmembran. Balkenlänge: 1,25 µm.

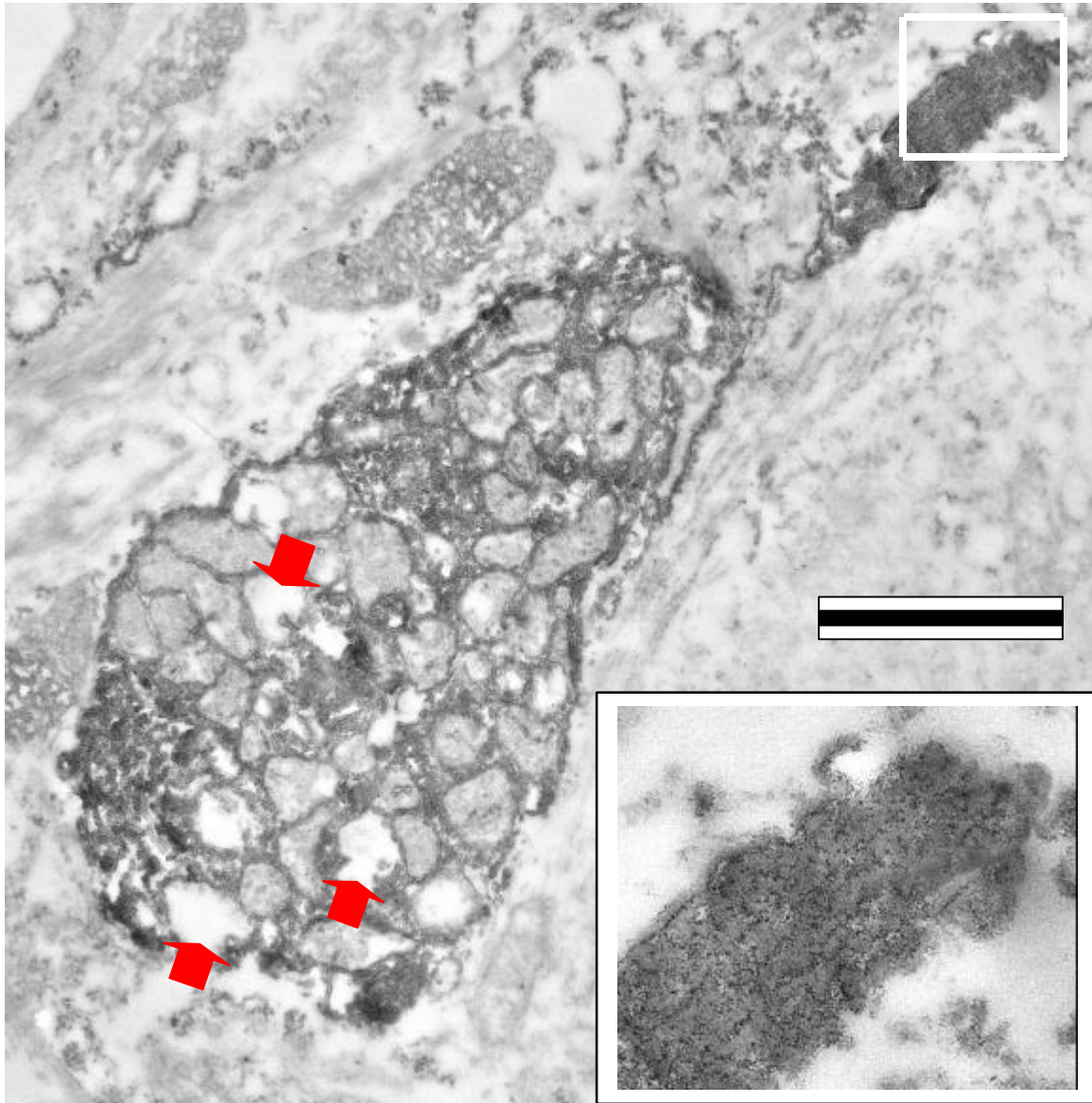


Abb. 36: Andere Schnittebene des Axonsprosses mit Wachstumskegel der Abb. 35, zehn Tage postoperativ. Das zuführende Axonsegment ist durch eine auffallende Längsstreifung (siehe Inset) charakterisiert. Der birnenförmige Wachstumskegel enthält zahlreiche Mitochondrien und GCV (roter Pfeil). Die vesikulären Strukturen im Wachstumskegel sind so prall angefüllt, dass das DAB-Präzipitat nur sehr spärlich nachweisbar ist. Balkenlänge: 1,25 μm .

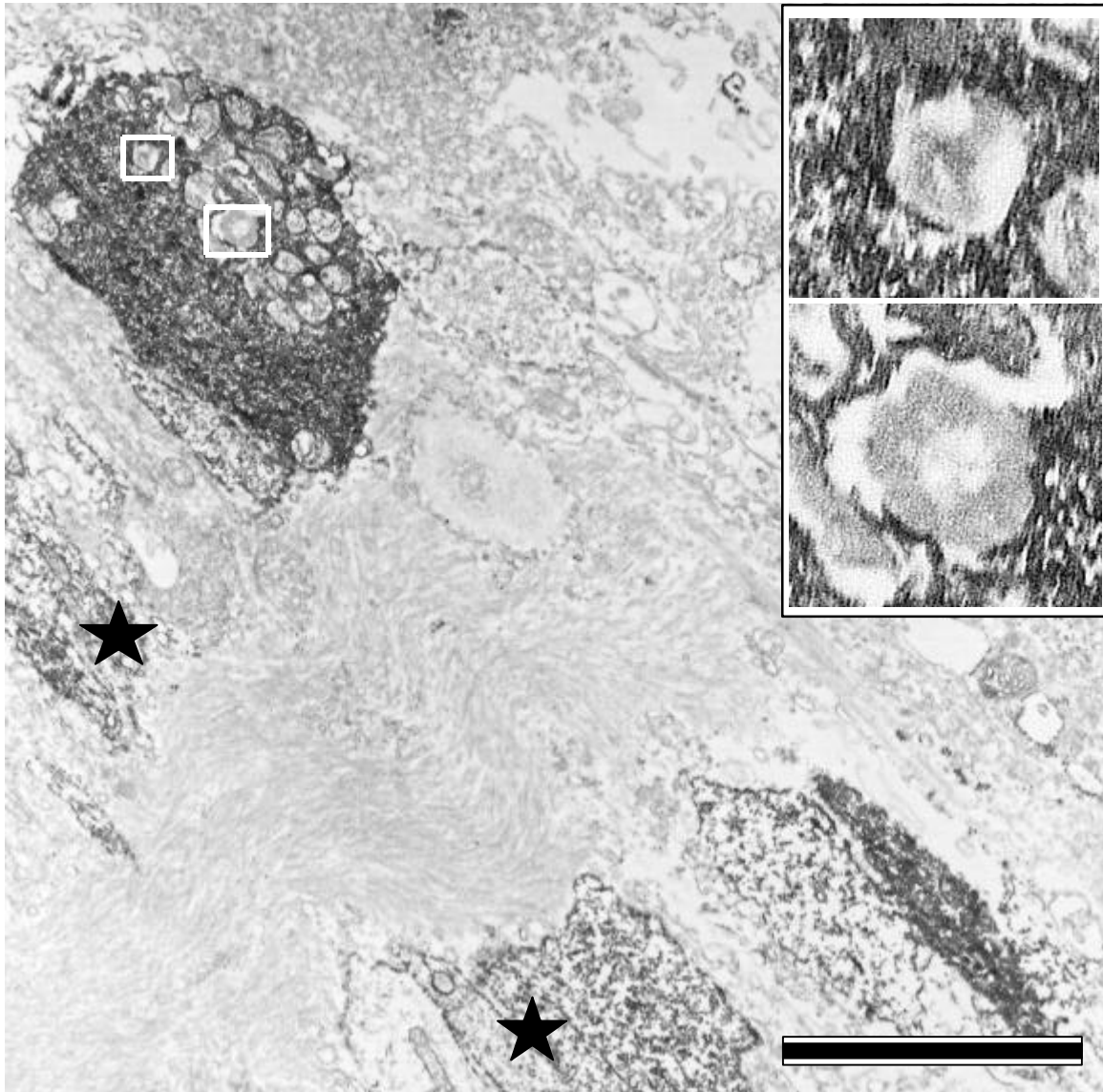


Abb. 37: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines intraretinalen Axonsprosses mit Wachstumskegel zwei Wochen nach einem *Nervus opticus-crush*. Die aberrante Neubildung in der Retina der Ratte entspricht dem Befund der Abb. 19. Das zuführende Axonsegment und der terminale Wachstumskegel sind noch deutlich voneinander getrennt. Im Wachstumskegel lassen sich einige Mitochondrien und GCV unterschiedlicher Größe (siehe Inset) identifizieren. Die GCV sind durch eine einfache Membran und das Vorhandensein von amorphem Inhalt charakterisiert. In unmittelbarer Nachbarschaft liegen gebündelte Nervenfasern (Sterne). Balkenlänge: 2,5 μm .

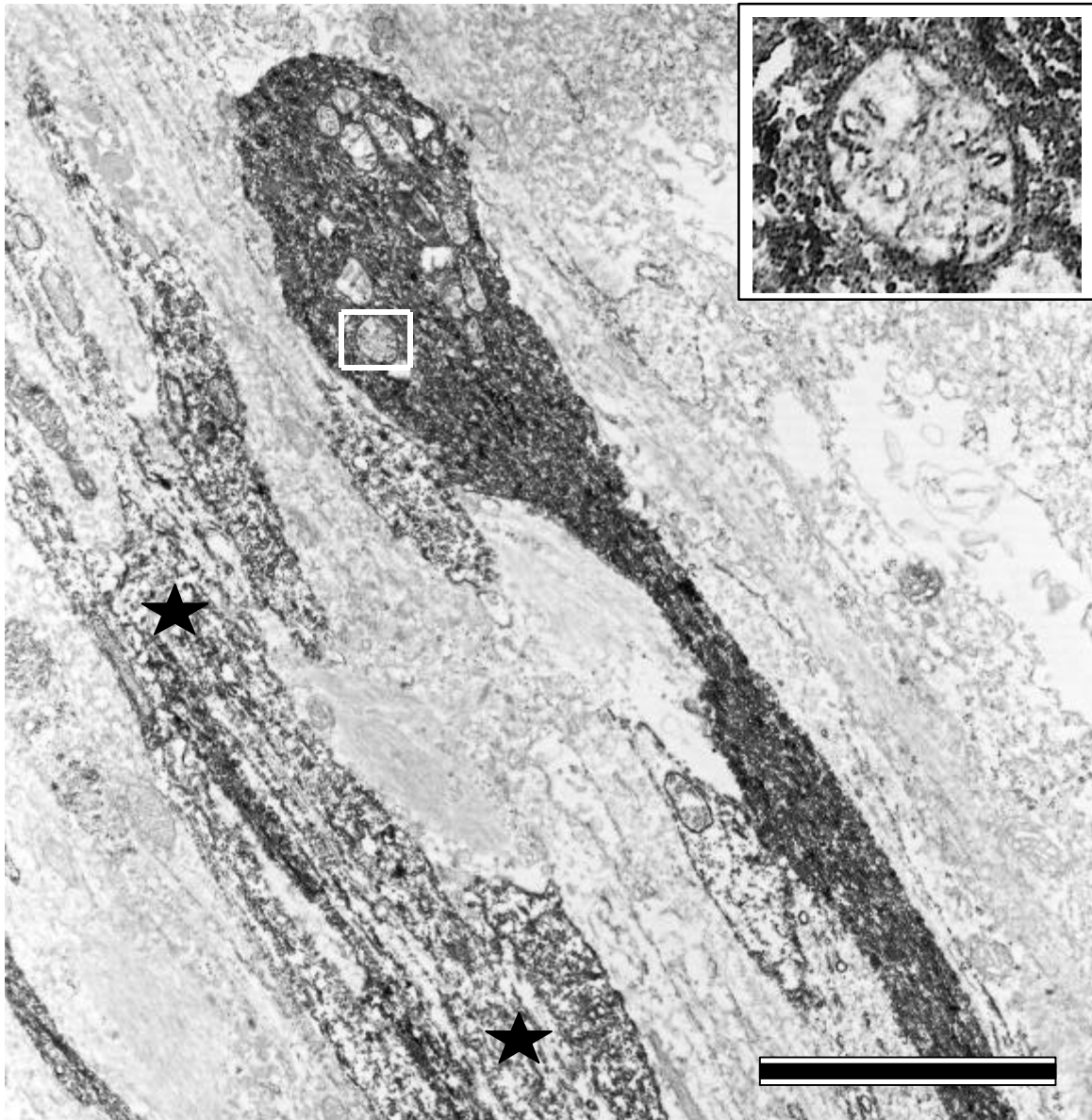


Abb. 38: BDA-markierter Axonspross mit Wachstumskegel zwei Wochen nach einem intraorbitalen *crush* des *Nervus opticus*. Andere Schnittebene des Wachstumskegels der Abb. 37. Darstellung der Zugehörigkeit des zuführenden Axonsegments zum terminalen Wachstumskegel. Der Wachstumskegel enthält Mitochondrien und GCV. Das Mitochondrium mit der weißen Umrahmung ist im Inset stark vergrößert dargestellt. Zu sehen sind die Doppelmembran, die Cristae und die zentrale Matrix. Der Wachstumskegel legt sich mit seiner Zellmembran an einen Axonfaszikel (Sterne) an. Balkenlänge: 2,5 μm .

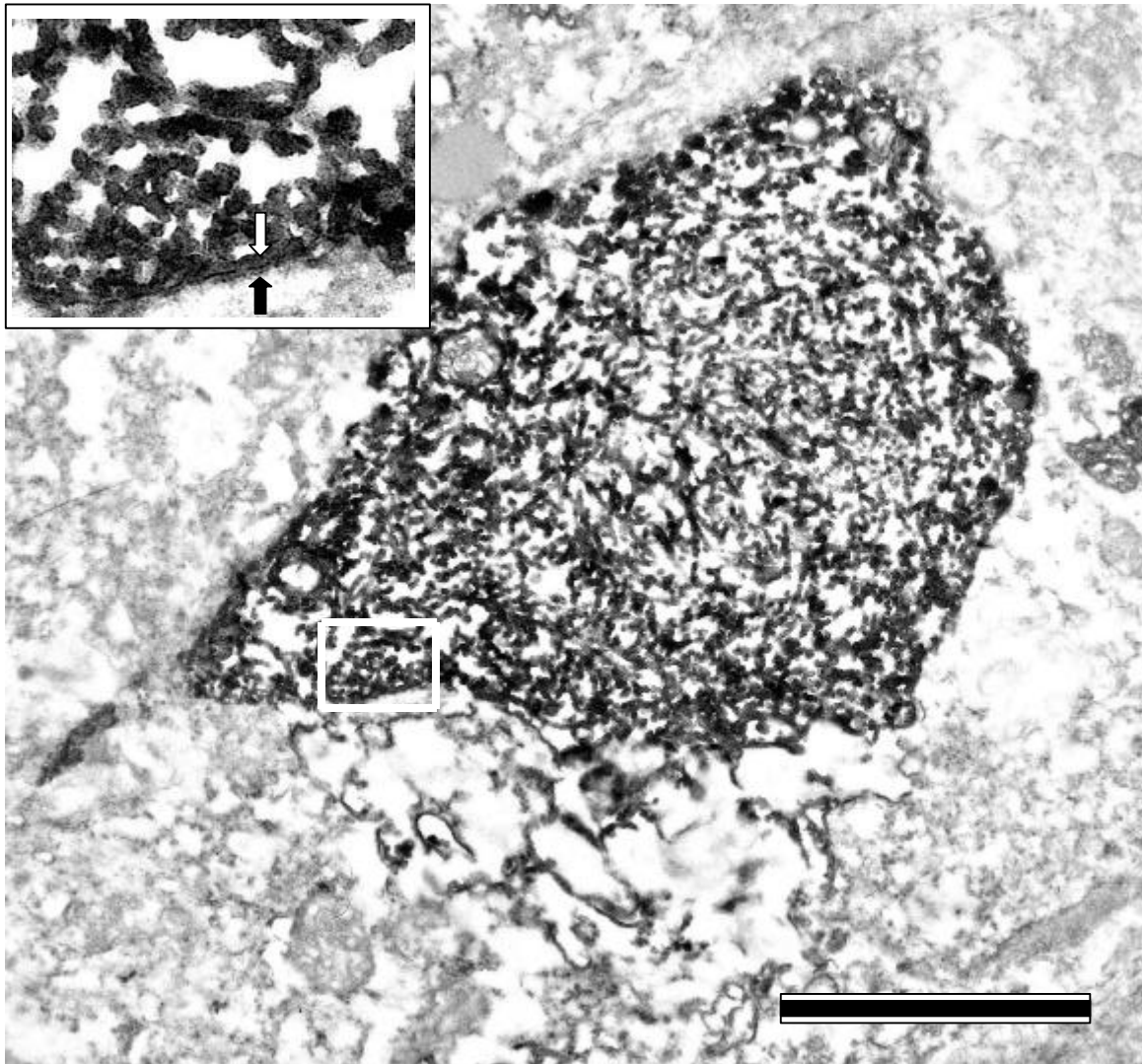


Abb. 39: BDA-markierter Axonspross mit Wachstumskegel drei Wochen nach einer intraorbitalen Quetschung des *Nervus opticus*. Die Aufnahme korrespondiert mit dem Befund der Abb. 21. Die Anzahl an Mitochondrien und GCV ist in diesem Wachstumskegel erstaunlich gering. Auffallend erscheint die lockere fast gitterartige Anordnung des DAB-Präzipitates im gesamten Wachstumskegel (siehe Inset). Der Wachstumskegel ist vom umliegenden Gewebe durch seine Doppelmembran abgegrenzt. Die kleinen Pfeile im Inset kennzeichnen die Doppelmembran. Balkenlänge: 2,5 μm .

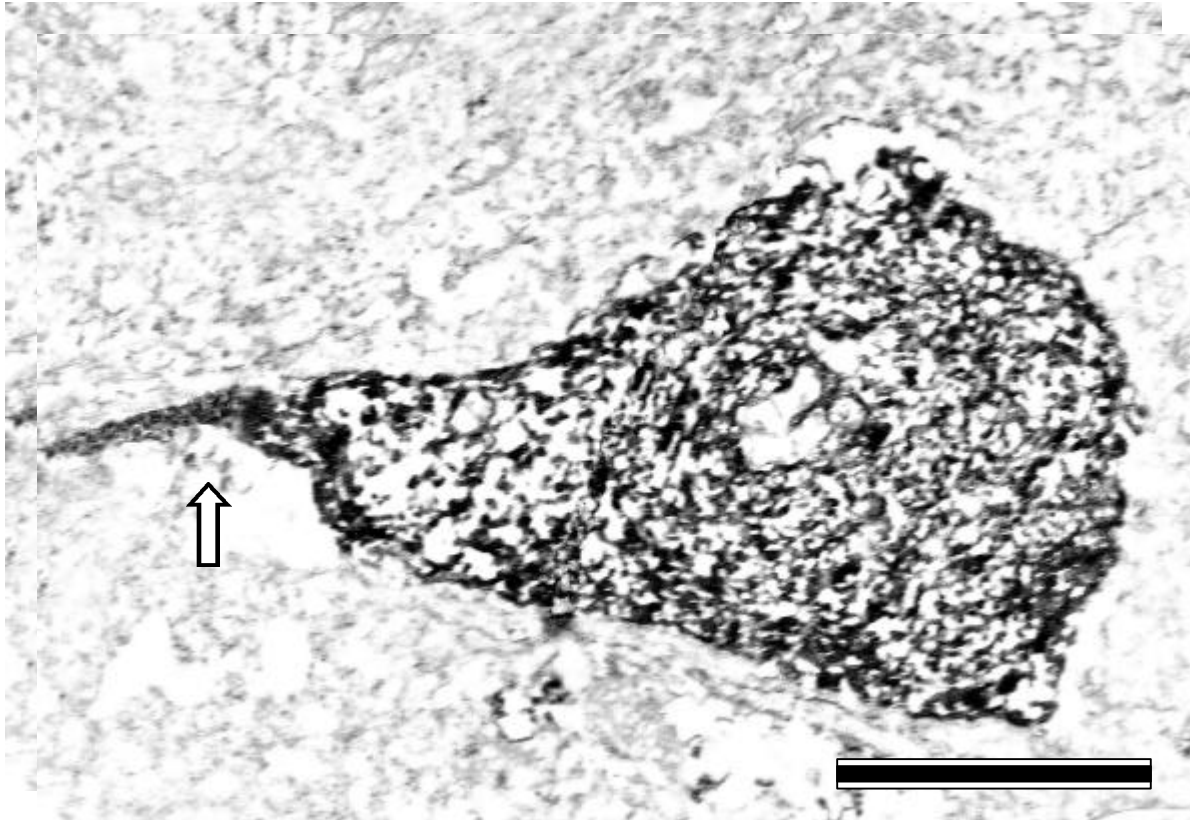


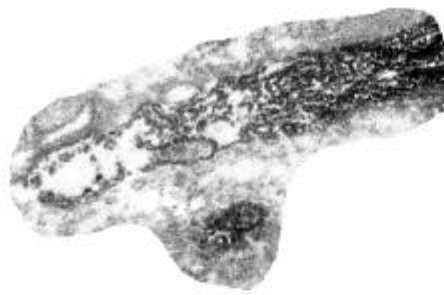
Abb. 40: Andere Schnittebene des Axonsprosses mit Wachstumskegel drei Wochen nach einem intraorbitalen *crush* des *Nervus opticus*. Darstellung der Zugehörigkeit des zuführenden Axonsegments zum Wachstumskegel (Pfeil). Dieser Schnitt ist durch das Vorhandensein einer großen Menge an DAB-Präzipitat und durch eine Abnahme an GCV, sowie das Fehlen von Mitochondrien charakterisiert. Balkenlänge: 2,5 μm .

4.4 Schnittbildserie eines intraretinalen Wachstumskegels vier Wochen nach Läsion

Die folgenden Abbildungen zeigen eine Montage unterschiedlicher Schnittebenen an einem intraretinalen Wachstumskegel, um einen Überblick über die räumliche Ausdehnung der aberranten Neubildungen zu erhalten. Der Wachstumskegel konnte nach einer postoperativen ÜLZ von vier Wochen in einer gequetschten Netzhaut dokumentiert werden. In einer gequetschten Retina der adulten Ratte wurden Wachstumskegel ohne neuroprotektive Maßnahmen auf licht- und erstmalig elektronenmikroskopischer Ebene gefunden und analysiert. Sie sind funktioneller Ausdruck des intrinsischen Regenerationspotentials der RGC.

Auf den zwei folgenden Seiten wird der Wachstumskegel der Abb. 41 wiedergegeben:

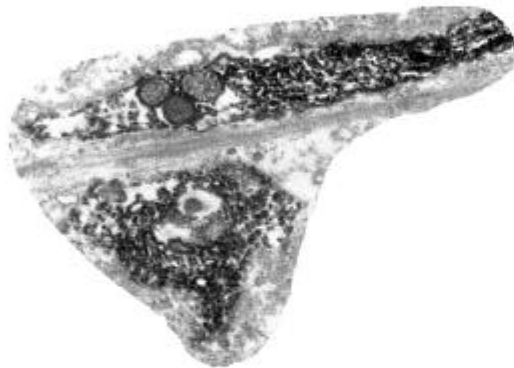
Abb. 41: Der Wachstumskegel entspricht dem lichtmikroskopischen Befund der Abb. 23. Der Schnitt, auf dem der Wachstumskegel zum ersten Mal aufgefunden wurde, ist hier mit der Schnitttiefe Null (Schnitt1: $z = 0$ nm) definiert. Der Wachstumskegel wurde bis zu einer Schnitttiefe von 4500 nm verfolgt (Schnitt13: $z = 4500$ nm). Die Gesamtbreite der Struktur beträgt 5000 nm. Balkenlänge: 2,5 μ m.



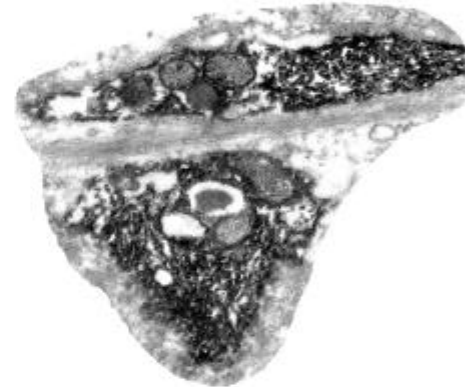
Schnitt 1: z=0 nm



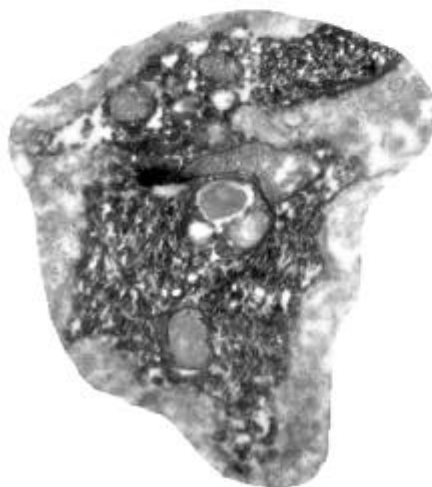
Schnitt 2: z=200 nm



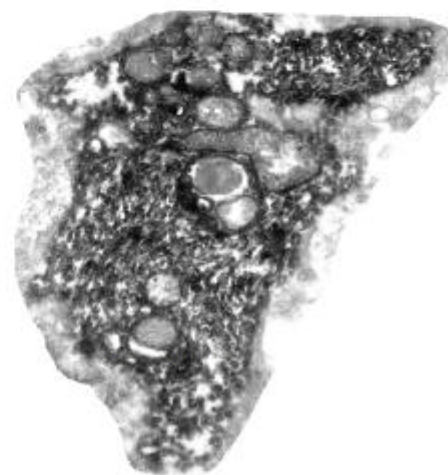
Schnitt 3: z=500 nm



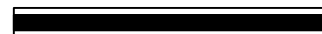
Schnitt 4: z=800 nm

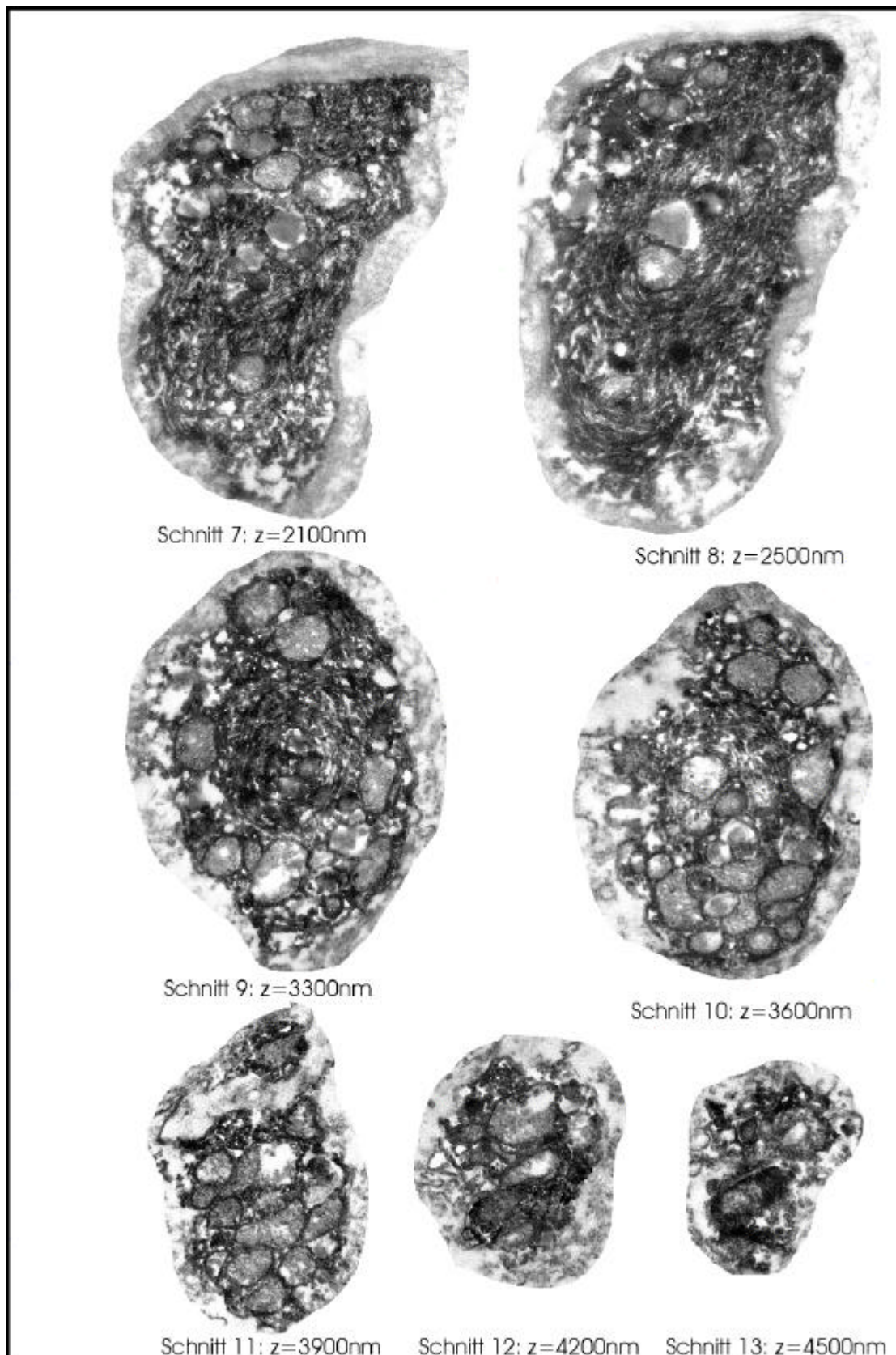


Schnitt 5: z=1200 nm



Schnitt 6: z=1600 nm





5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit waren die Nervenfasern der retinalen Ganglienzellen Gegenstand der Analysen. Nach einer Durchtrennung des intraorbital gelegenen NO wurden sie nach verschiedenen postoperativen ÜLZ in der Netzhaut der adulten Ratte untersucht. Die Morphologie der Axone der Nervenfaserschicht wurde auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene bearbeitet. Es existieren bereits zahlreiche Befunde, die den Nachweis erbrachten, dass die Nervenzellen des ZNS bei Säugetieren ein beträchtliches intrinsisches Regenerationspotential besitzen. Durch die Applikation von neurotrophen Substanzen (SIEVERS et al. 1987; THANOS et al. 1989) oder mit Hilfe neuroprotektiver Maßnahmen, wie Transplantations- (RICHARDSON et al. 1982a; SO und AGUAYO 1985; VILLEGAS-PEREZ et al. 1988a; BRAY et al. 1992) und Implantationsversuchen (CHO und SO 1992), konnten die Überlebensfähigkeit und darüber hinaus die Elongation von Axonen geschädigter Neurone positiv beeinflusst werden.

Die Befunde dieser Dissertation zeigen jedoch erstmalig, dass auch ohne neuroprotektive Maßnahmen axotomierte RGC Wachstumskegel ausbilden können.

5.1 Kritik der Methodik

5.1.1 Kontrollexperimente

In den Kontrollnetzhäuten wurden die intakten Retinae präpariert, *in toto* fixiert und mit DiI markiert. Aufgrund der hohen Affinität des DiI zu aldehydfixierten Zellmembranen (GODEMENT et al. 1987) konnten die Axone der Nervenfaserschicht eindeutig dargestellt und dokumentiert werden. Der FFS DiI kann sich nicht nur in fixierten Membranen ausbreiten. Der hochlipophile Carbocyaninfarbstoff besitzt auch die Fähigkeit, sich in die Membran von lebenden Axonen und Dendriten einzulagern (THANOS 1988b). Der FFS wird in die Zellmembran inkorporiert und von Transportvesikeln aufgenommen. Die Internalisation des DiIs als Membrankomponente sowie der schnelle retrograde Transport von DiI-enthaltenden Vesikeln resultieren in einer Füllung des Perikaryons und der Dendriten (HONIG und HUME 1986). Sowohl die laterale Diffusion als auch der intraaxonale Transport müssen als synergistische Effekte bei der anterograden und retrograden Markierung berücksichtigt werden (THANOS und BONHOEFFER 1987). Die von den Kontrolltieren stammenden Netzhäute wurden nach dem Protokoll von GODEMENT et al. (1987) mit dem FFS DiI- markiert. Die jeweils in einer Kleeblattform ausgebreitete Retina ließ Axonfaszikel erkennen, die sich entsprechend der halbkugelförmigen Netzhaut konvergierend zum

Discus nervi optici orientierten. Es sind nicht alle Axone markiert worden, da das DiI in seinem kristallinen Zustand nur an ausgewählten Stellen um den Diskus platziert wurde. Folglich konnten nur die retinalen Nervenfasern und Ganglienzellen markiert werden, die in unmittelbarer Nähe der applizierten DiI-Kristalle lagen. Die DiI-markierten Nervenfasern ergaben kein vollständiges Bild der intakten Netzhaut. Der Vorteil dieser Kontrollmarkierung ergibt sich aus der separaten Axondarstellung. So konnte das Gesamtbild einzelner Axone leichter dokumentiert werden. Die Anwendung von DiI in den Läsionsexperimenten wäre möglich gewesen, jedoch ließen sich die Instabilität der Fluoreszenz und die zeitlich aufwendigen Untersuchungen der aberranten Fortsätze nicht miteinander vereinbaren. Die Dokumentation der axonalen Neubildungen erforderte eine dauerhafte und zuverlässige Markierung sowohl auf licht- wie auch auf elektronenmikroskopischer Ebene.

Für die retrograde Markierung der RGC in den Läsionsexperimenten erwies sich das BDA als das Mittel der Wahl. Dennoch konnte das BDA aufgrund seiner langen Anflutungszeit von drei Tagen (VEENMAN et al. 1992) nach der Applikation nicht für die Kontrolltiere eingesetzt werden. Diese Zeitspanne hätte bereits zu retrograden Degenerationserscheinungen der Nervenfasern- und Ganglienzellschicht der Retina geführt und war somit für die Kontrollexperimente zu groß.

5.1.2 Läsionsexperimente

Der *Nervus opticus-crush* wurde aus drei Versuchsansätzen entwickelt. Die Quetschung des Sehnervs mit Hilfe einer gebogenen Pinzette konnte problemlos und schnell über eine Zeitdauer von 30 s bei einer moderaten Druckstärke durchgeführt werden. Die zu den mechanischen Axotomien zählende Quetschung ist eine allgemein anerkannte und häufig angewandte Axotomiemethode, jedoch sollte man einige Risikofaktoren berücksichtigen. Bei der Schnittaxotomie kann man mit höchster Sicherheit davon ausgehen, dass es zu einer Unterbrechung aller Axone im Sehnerv kommt. Diese Zuverlässigkeit kann eine unkontrollierte Quetschung nicht gewährleisten. Es existieren variable Faktoren, die für alle Experimente nicht repräsentativ sein können. Bei einer normal gebogenen Pinzette, die vom Operateur gehalten und zusammengedrückt wird, ist es nicht möglich, exakt gleiche Drücke (leicht, moderat, stark) auf die Pinzettenblätter auszuüben. SAUTTER (1991) verwendete deshalb eine von ihm selbst modifizierte Läsionspinzette mit flachen Pinzettenblättern und einer Mikrometerschraube zur Einstellung der Quetschstärke (kontrollierte Quetschung). Des Weiteren ist bei der Quetschung zu berücksichtigen, dass auf alle Axone des NO nicht genau dergleiche mechanische Druck ausgeübt wird. Die relative Lage der Axone zwischen den Pinzettenblättern, z.B. zentral oder peripher, könnte von entscheidender Bedeutung dafür sein, welche Axone besonders geschädigt werden und welche Axone von der Quetschung ganz bzw. teilweise verschont bleiben. In einem mechanischen Nervenkompressionsmodell wurden die peripher liegenden Fasern stärker komprimiert als im Zentrum (WEISS und HISCOE 1948). Nervenfasern mit größerem Durchmesser reagierten empfindlicher auf einen

mechanischen Druck bzw. auf eine Kompression als dünnere Fasern (Mac GREGOR et al. 1975). Wichtig ist auch die Lage des Tieres während der Operation und die Lage der Pinzettenblätter am NO. Da die Ratte in den eigenen Versuchen auf dem Bauch (in situ) lag und die Pinzette horizontal gehalten wurde, wäre es denkbar, dass die lateral und medial liegenden Axone weniger stark betroffen waren als die dorsalen und ventralen Axone, da sie dem direkten Druck der Pinzettenblätter während des Quetschvorganges seitlich mehr ausweichen konnten. Die unter visueller Kontrolle mit Hilfe des Operationsmikroskops sichtbaren Sehnervstümpfe waren der Beweis für die vollständige Axotomie des Sehnervs ohne Eröffnung des Epineuriums. MISANTONE et al. (1984) untersuchten nach einer Quetschung des NO ultrastrukturell den distalen Stumpf. Eine WALLER-Degeneration aller Nervenfasern gab ihnen die Bestätigung für eine komplette Durchtrennung aller Axone im Sehnerv. SAUTTER (1991) hingegen machte sich zur Überprüfung einer kompletten Axotomie beim graduellen *crush* den retrograden Transport der Axone zunutze. So konnte er nach moderater Quetschung eine Transportrate von 11 % aller RGC und nach starker Quetschung von 7 % aller RGC beobachten.

Der Schwachpunkt des NO-*crush* liegt in der operativen Vorgehensweise. Es wurde eine einfache gebogene Pinzette verwendet, die nicht auf eine bestimmte Druckstärke eingestellt werden konnte, um eine kontrollierte, reproduzierbare und graduelle Läsion von Tier zu Tier zu gewährleisten. Es könnten jedoch folgende konstante Parameter für eine kontrollierte Quetschung des NO geltend gemacht werden:

- Nutzen einer Tierart gleichen Alters und Gewichts,
- operative Durchführung am analogen Läsionsort,
- Ausführen des invasiven Eingriffs durch identischen Operateur,
- Verwendung der gleichen gebogenen Pinzette bei den Versuchen,
- Ausüben eines motorisch gleichmäßigen mittelstarken Drucks (individuelles Empfinden) auf beide Pinzettenblätter über eine Zeitdauer von 30 s,
- Überprüfen des Auseinandergleitens der durchtrennten Nervenstümpfe mit dem OP-Mikroskop als Nachweis einer vollständigen Axotomie.

Die intakt gebliebene Epineuriumhülle erfüllte zwei wichtige Aufgaben. Zum einen war eine ausreichende Blutversorgung gewährleistet (kein direkter Einschnitt ins Epineurium), zum anderen fungierte die äußere Nervenülle als Haltevorrichtung beider Nervenstümpfe. Diese Fixierung erleichterte das erneute Freilegen des okulären Sehnervstumpfes zum Zeitpunkt des zweiten invasiven Eingriffs. Durch die Quetschung des NO unterlagen die Neurone in der Ganglienzellschicht der adulten Ratte einer langsamen retrograden Degeneration (MISANTONE et al. 1984). MISANTONE et al. (1984) konnten zwei Phasen ermitteln. Während der ersten Phase,

die sich bis zu einem Monat nach dem *crush* erstreckte, wurde eine deutliche Schrumpfung der Zellen beobachtet. In der zweiten Phase erholten sich einige Neurone teilweise, die anderen degenerierten. Die kurzzeitige Reaktion ist auf die Axotomie zurückzuführen. Ähnliche Befunde beschrieben GRAFSTEIN und INGOGLIA (1982) bei axotomierten Mäusen. Wird der Sehnerv nicht gequetscht, sondern einer Schnittaxotomie unterzogen, verläuft die Degeneration der RGC schneller und stärker. Der Zelltod findet innerhalb der ersten Wochen postoperativ statt. Die Darlegung der verschiedenen Charakteristika der Axotomieformen besitzt bei der Interpretation der eigenen Befunde eine große Bedeutung. Durch eine moderate Quetschung wird eine Mikroläsion gesetzt, die zu einer verzögerten und abgeschwächten Degeneration der RGC führt. Ein weiteres Merkmal der Mikroläsion ist die Aufrechterhaltung einer weitestgehend normalen zellulären Umgebung, charakterisiert durch Oligodendrozyten und Astrozyten Typ I und Typ II (DAVIES et al. 1996).

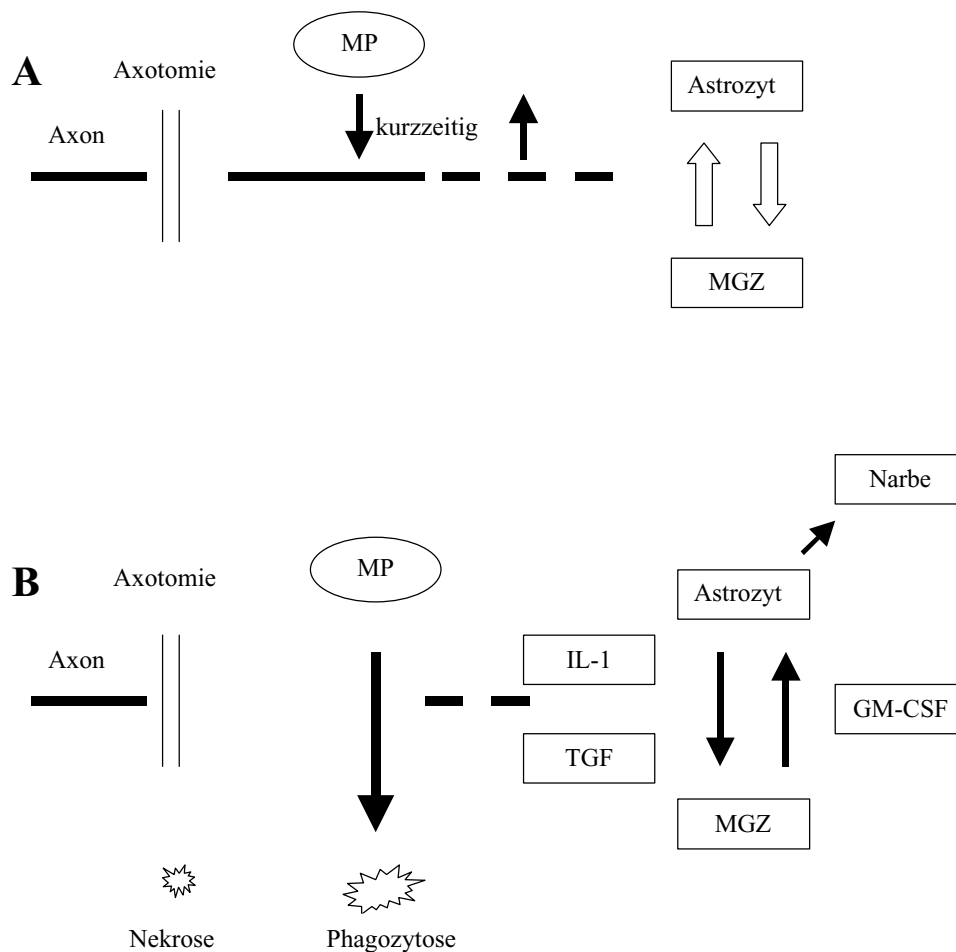


Abb. 42: Axotomieinduzierte Signalkaskaden nach leichten (A) und schweren (B) Schädigungen des *Nervus opticus* (nach DAVIES et al. 1996)

A: Mikroläsionen führen zu einem kurzzeitigen Influx von amöboiden MP/MGZ (MP), die durch das Fehlen von nekrotischem Material den Läsionsort sehr schnell wieder verlassen. Es kommt nur zu einer kurzzeitigen Stimulation von residenter verzweigter Mikroglia (MGZ) und Astrozyten, wahrscheinlich bedingt durch eine ungenügende Auslösung der Signalkaskade.

B: Nach größeren Läsionen, die mit Nekrosebildung, Blutungen und Exsudation einhergehen, halten die amöboiden MP/MGZ ihren aktivierten Zustand über lange Zeit aufrecht. Sie beginnen das nekrotische Material und den Zelldebris zu phagozytieren und persistieren ebenfalls am Verletzungsort, wobei sie eine positive Feedback-Kaskade kontinuierlich unterstützen, dazu gehören Interleukin-1 (IL-1), der *transforming growth factor* (TGF) und der *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (THERY und MALLAT 1993). Ausgelöst durch diese Kaskade kommt es zu einer wechselseitigen Aktivierung von Astrozyten und verzweigten MGZ, in deren Verlauf sich eine Astrozytennarbe entwickelt (LOGAN et al. 1994).

5.1.3 Retinale Blutversorgung

Eine vollständige Unterbrechung der retinalen Blutversorgung hätte eine ischämische Degeneration der RGC zur Folge. Der intraorbitale Axotomieort darf nicht in weniger als 1 mm Distanz vom Augapfel lokalisiert werden (KIERNAN 1985), da sich in diesem Bereich die *A. centralis retinae* im Sehnerv befindet. Ab einer Distanz von 1 mm verläuft dann die *A. ophthalmica* parallel zum Sehnerv in ihrer schützenden meningealen Hülle. Es wurde bei der Durchführung der intraorbitalen Durchtrennung des NO zur Applikation des BDA sowohl der Abstand zum Augapfel als auch der longitudinale Einschnitt zur Eröffnung des Epineuriums genau überprüft. Bei einer Quetschung des NO sind neben der beschriebenen Lokalisation auch die Stärke der Quetschung und die Quetschdauer für das Ausbleiben einer ischämischen Ganglienzelldegeneration entscheidend. Nach einer leichten Quetschung bleibt die arterielle Versorgung intakt (SCHLOTE 1970). Bei Quetschungen, die eine Zeitdauer von max. 30 s nicht überschreiten, wurde die Blutversorgung der Retina nicht dauerhaft unterbrochen (eigene Beobachtung). Unkontrollierte sehr starke und langandauernde Quetschungen führen zweifellos zu einer Unterversorgung der Retina mit typischen ischämischen Ausfallerscheinungen. Nach jedem invasiven Eingriff wurde am Tier eine ophthalmoskopische Fundusbeurteilung durchgeführt. Für eine ausreichende Versorgung war die Analyse von mindestens zehn Fundusgefäßen maßgeblich. Darüber hinaus wurden bei allen Retinapräparaten keinerlei Anzeichen einer nekrotischen Gewebereaktion gefunden. Die axotomierten Netzhäute waren leicht zu präparieren und zeigten im Vergleich zu den Kontrollnetzhäuten keine geweblichen Veränderungen. Eine Unterbrechung der retinalen Blutzufuhr hätte eine Nekrose und eine Schrumpfung des Gewebes zur Folge haben müssen (MADISON et al. 1984).

5.2 Diskussion der Befunde

5.2.1 Kontrollexperimente

Es war schwierig, die Axone der Nervenfaserschicht einer ungeschädigten Netzhaut klar und deutlich darzustellen. In den Kontrollnetzhäuten wurden Retinaareale dokumentiert, in denen die einzelnen DiI-markierten Axone sehr gut zu finden waren. In der Netzhaut der adulten Albinoratte existieren ca. 115000 Ganglienzellen (SCHOBER und GRUSCHKA 1977). SCHOBER und GRUSCHKA (1977) konnten nur eine absolute Zellzahl von 108000 bzw. 111000 Ganglienzellen pro Retina unter dem Lichtmikroskop ermitteln. Die Anzahl erhöht sich jedoch durch Vernachlässigen der präparationsbedingten Peripherieverluste auf 115000 Zellen in der Ganglienzellschicht. Die Angaben von FORRESTER und PETERS (1967), die die absolute Axonanzahl im NO der adulten Albinoratte anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen mit 117000 angeben, lassen eine Übereinstimmung erkennen. Ein sicheres Identifikationskriterium für RGC ist die Anwesenheit eines Axons im Sehnerv. Basierend auf dieser Feststellung müssten die quantitativen Analysen identisch sein. Die minimale Differenz lässt sich vermutlich auf verschiedene Untersuchungsmethoden zurückführen.

Die große Anzahl der Axone der Nervenfaserschicht erschwerte eine präzise Markierung von separaten Axonen. In der Arbeit von ALLCUTT et al. (1984b) wurde eine *whole-mount*-Retina als Kontrolle analysiert. Die unoperierte Retina wurde mit einer Silberimprägnationstechnik markiert. Es waren radiär orientierte Axonfaszikel in einem strangartigen Verlauf erkennbar. Die vollständig markierten Axone einer intakten Retina gestatten durch ihre Faszikelbildung nicht oder nur sehr schwer eine präzise Analyse einzelner Strukturen.

Ein Befund an den Axonen der Kontrollnetzhaut der vorliegenden Arbeit waren Kontinuitätsunterschiede des Axondurchmessers in Form von Schwellungen. Sie waren insbesondere an den Axonen, die von einem Faszikel in den nächsten wechselten, aber auch an Axonen im Faszikel sichtbar.

Es war überraschend, die Schwellungen an den Axonen intakter Netzhäute festzustellen, da das Auftreten von Schwellungen oder Varikositäten hauptsächlich im unmittelbaren Zusammenhang mit neuroaxonalen Degenerationen gefunden wurde (WISNIEWSKI et al. 1984; GRIFFITH et al. 1985; STEPHENSON et al. 1992). Diese Schwellungen wurden als histopathologische Erscheinungsform einer progressiven Axonopathie gewertet. Die Ursachen neuroaxonaler Degenerationen können vielfältig sein, mechanische Traumen, Ischämien, hereditäre Erkrankungen oder Intoxikationen. Eine mögliche Erklärung für axonale Schwellungen in einer intakten Netzhaut wäre ein subklinischer retinaler Prozess, eventuell in Form einer bulbären Entzündung oder einer Neuritis des NO. Da es sich aber um drei verschiedene Tiere mit unauffälligen Verhaltens- und

Sinnesmustern handelte, wäre es spekulativ, neuronale Erkrankungen zu vermuten. Übereinstimmende Ergebnisse mit den eigenen Untersuchungen an einer fixierten DiI-markierten Netzhaut erzielte die Arbeitsgruppe um THANOS et al. (1991). Sie untersuchten menschliche postmortale Retinae, um morphologische Veränderungen an den RGC zu dokumentieren. Sie verwendeten Probenmaterial von normalen gesunden Netzhäuten. 12 bis 36 Stunden *post mortem* wurden die Netzhäute präpariert und fixiert. Die Markierung der RGC mit ihren Fortsätzen wurde sowohl in den Untersuchungen von THANOS et al. (1991) als auch in den eigenen Untersuchungen nach dem Protokoll von GODEMENT et al. (1987) ausgeführt. Bei der Analyse der DiI-markierten Axone (THANOS et al. 1991) in der Nervenfaserschicht ließen sich Axone unterschiedlichen Kalibers erkennen. So konnten dicke Axone mit gleichmäßigen Schwellungen von dünneren Axonen mit asymmetrischen Schwellungen differenziert werden. Die verschiedenen Durchmesser der Axone korrespondieren mit unterschiedlichen Ganglienzelltypen (WATANABE und RODIECK 1989). THANOS et al. (1991) beschrieben eine postmortale Ganglienzelldegeneration. Jedoch waren die morphologischen und quantitativen Charakteristika der RGC-Typen der humanen Retina bemerkenswert unverändert. Auch RODIECK et al. (1985) konnten an humanen RGC geschwollene Zellkörper und Schwellungen an Axonen und Dendriten 12 bis 36 Stunden nach dem Tod feststellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Schwellungen die Folge von postmortalen Zellveränderungen sein könnten.

WATANABE und RODIECK (1989) wiesen bei der Aufbereitung einer frischen Affenretina das Auftreten von Schwellungen nach, die durch Schädigungen während der Präparation entstanden waren. Die kleinsten Erschütterungen während der Präparation an der papierdünnen Netzhaut können zu partiellen Dehnungsschädigungen der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht führen. Verstärkt werden die auftretenden Mikrokräfte durch das flache Ausbreiten der halbkugelförmigen Netzhaut sowie durch den Verlust des schützenden Glaskörpers auf der Nervenfaserschicht. Dehnungsläsionen des NO beim Meerschweinchen hatten die Zerstörung des axonalen Zytoskeletts zur Folge (MAXWELL und GRAHAM 1997). Eine Unterbrechung der Mikrotubuli und Neurofilamente kann zu einem Sistieren des axonalen Transports und zu einer Akkumulation von Transportvesikeln führen. Die fokale Ablagerung der Vesikel und axonalen Organellen führt zur Entstehung dieser Auftreibungen.

Für das Auftreten von axonalen Schwellungen in den Kontrollretinaen könnten demnach auch mehr oder weniger starke präparationsbedingte Gewebeerschütterungen verantwortlich sein. Des Weiteren müssen schnell einsetzende anoxämische Zustände in Kombination mit dem neuronalen Zelltod diskutiert werden. Als Faustregel gilt: Hochdifferenzierte Zellen und Gewebe, wie Gehirn und Herz mit einem sehr hohen Sauerstoffbedarf, besitzen nur wenige Minuten Überlebensdauer (WEISS 1990, S. 378). Es könnte demnach möglich sein, dass die Perfusionszeitdauer im Allgemeinen ausreicht, um in den RGC eine veränderte Stoffwechselsituation, eventuell durch den stetig sinkenden Sauerstoffgehalt, hervorzurufen. Das Axon kann nun sowohl auf das Versiegen

seiner einzigen Stoffwechselquelle mit neurodegenerativen Anzeichen reagieren (indirekt) als auch durch den anoxämischen Zustand selbst betroffen sein (direkt). Es wurde beschrieben, dass Axone durch das Vorhandensein eines Sauerstoffdefizits infolge fokaler zerebraler Ischämien axonale Schwellungen ausbilden können (STEPHENSON et al. 1992).

5.2.2 Läsionsexperimente

Schwellungen

Schwellungen oder Varikositäten an den Axonen sind deutliche Kontinuitätsunterschiede des Schaftdurchmessers. Die Morphologie von Schwellungen ist variabel und die Ursachen ihres Auftretens können verschiedenartig sein. In dieser Arbeit wurden sie als spindelförmige, ballonierende und breitbasig polypöse Schwellungen klassifiziert. WILKINSON et al. (1999) konnten in ihren Studien einen Zusammenhang zwischen der Durchschnittsgröße von axonalen Schwellungen und der ÜLZ bis 85 Stunden nach der Läsion ermitteln. Nach längeren ÜLZ ließ sich diese Signifikanz jedoch nicht mehr feststellen. Anhand der vorliegenden Versuche konnte keine positive Korrelation zwischen der Schwellungsgröße und der ÜLZ gezeigt werden.

Schwellungen an den Axonen zentraler Neurone können auf postmortale, präparationsbedingte, degenerationsbedingte oder regenerationsbedingte Ursachen zurückgeführt werden. Postmortal bedingte (THANOS et al. 1991) und präparationsbedingte axonale Schwellungen (WATANABE und RODIECK 1989) wurden bereits eingehend in der Diskussion zur Kontrollnetzhaute erläutert.

Im Verlaufe zahlreicher Erkrankungen des Gehirns und des Rückenmarks konnten degenerationsbedingte Anschwellungen an den Axonen dokumentiert werden. Bei der neuroaxonalen Dystrophie handelt es sich um eosinophile, meist homogene, selten körnig-schaumig erscheinende Auftreibungen axonaler Fasertrakte im ZNS. Diese auch als Sphäroide bezeichneten Axonschwellungen sind zum Teil als floride *dying back*-Phänomene, so etwa bei traumatischen, toxischen, allergischen und erregerbedingten Läsionen charakterisiert worden (DAHME 1989, S. 276). Eine veterinärmedizinische Pathologie ist die progressive Axonopathie des Boxers. Es handelt sich um eine autosomal rezessive hereditäre Neuropathie mit Beteiligung von ZNS und PNS. Zahlreiche axonale Schwellungen konnten in den lateralen und ventralen Funiculi des Rückenmarks, in unterschiedlichen Hirnstammkernen und am *Tractus opticus* im Bereich des *Chiasma opticum* festgestellt werden (GRIFFITH et al. 1985).

Zu den Erkrankungen beim Menschen, die mit axonalen Schwellungen einhergehen, gehören z.B. stumpfe Schädeltraumen und diffuse axonale Schädigungen, bei denen primär die weiße Substanz des Gehirns traumatisch geschädigt wurde (ADAMS et al. 1982). Die Axone sind durch ein graduelles Schädigungsspektrum charakterisiert. Axonale Schwellungen traten ebenfalls beim

Herpes zoster (RUPPENTHAL 1980) und bei der Nieman-Pick-Krankheit an nicht pyramidalen Nervenzellen auf (BRAAK und BRAAK 1985).

Degenerationsinduzierte axonale Varikositäten konnten durch experimentelle Versuche mit Aluminium beim Kaninchen (WISNIEWSKI et al. 1984) und mit Kalzium bei der Ratte (BALENTINE und GREENE 1984) gefunden werden.

Traumatisch bedingte Schwellungen sind durch die Akkumulation von zellulären Organellen (WILKINSON et al. 1999) und Proteinen, insbesondere durch den hohen Gehalt an Amyloid-Precursor-Protein, charakterisiert (STEPHENSON et al. 1992; GRAHAM et al. 2000). Große Schwellungen im Rückenmark von Patienten, die an einer Motoneuron-Erkrankung gelitten haben, zeigten eine massive Anhäufung der mikrotubuliassoziierten ATPase Kinesin und von hoch phosphorylierten Neurofilamenten. Die Menge des zytoplasmatischen Dyneins hingegen war gering (TOYOSHIMA et al. 1998).

Schwellungen treten auch in unmittelbarem Zusammenhang zu regenerativen axonalen Prozessen auf. So ließen sich an elongierenden Axonen Schwellungen identifizieren, die in ein Transplantat penetrierten (THANOS und VANSELOW 1990). Axonale Schwellungen während der Regeneration sind u.a. ultrastrukturell durch eine vermehrte Ansammlung von Mitochondrien gekennzeichnet. Es lässt sich vermuten, dass der erhöhte Stoffwechsel in der Zelle für die Synthese von neuen Zellbestandteilen und ein damit verbundener gesteigerter Axontransport einen Anstieg der mitochondrialen Aktivität erfordern. In einer licht- und elektronenmikroskopischen immunzytochemischen Studie an adulten Katzen, die nach einer traumatischen Hirnschädigung 22 bis 28 Tage überlebten, konnte eine erhöhte Immunreaktion von *growth-associated-protein-43* (GAP-43) in reaktiven axonalen Schwellungen im Hirnstamm nachgewiesen werden. Diese Untersuchung verstärkt die Vermutung, dass in diffus geschädigten Axonen ein Regenerationsversuch erfolgt. Es kommt zu einer Reorganisation ihres Zytoskeletts verbunden mit einem Anstieg an Wachstumsproteinen (CHRISTMAN et al. 1997).

Dornenförmige Fortsätze

Das Auftreten von dornenförmigen Fortsätzen *spine-like processes* während der embryonalen Axonbildung in der isolierten Retina *in vitro* wurde von BRITTIS und SILVER (1995) beschrieben. In Studien, die sich mit entwickelnden RGC (RAMOA et al. 1987; WONG 1990; LAU et al. 1992) und mit regenerierenden Ganglienzellen (LAU et al. 1991) beschäftigten, konnten ebenfalls dornenförmige Fortsätze dokumentiert werden.

Nach der Implantation eines peripheren Nervensegments in den Glaskörper bei gleichzeitiger Axotomie des NO wiesen eine Vielzahl von RGC dendritische Dornen auf. Die von LEI et al. (1995) durchgeführten Versuche an Hamstern zeigten aberrante Neubildungen in Form von *spine-*

like processes an den Dendriten, am Soma und an den Axonen der Ganglienzellen. Sie definierten die Neubildungen mit einer Länge bis 5 µm als *spine-like processes* und mit einer Länge über 5 µm als *axon-like processes*. Nach einem Zeitraum von zwei Wochen waren 80 % der Dornen an den Dendriten lokalisiert, nach acht Wochen nur noch 60 %. Im Gegensatz dazu stieg die Zahl der Dornen am Soma und am Axon an. Bei Sprague-Dawley-Ratten konnten in einer axotomierten Netzhaut kleine Verzweigungen mit einer Länge von weniger als 5 µm festgestellt werden (SAWAI et al. 1996). Die Untersuchung vier bis sechs Stunden nach der Axotomie ergab eine Messung dieser Fortsätze von 87%. Nach zwei Wochen konnten nur noch 26 % an den Axonen gefunden werden. In den eigenen Versuchen konnten sie in einer Netzhaut nach einer kurzen ÜLZ (drei Wochen) und einer langen ÜLZ (sechs Monate) an den Nervenfasern nachgewiesen werden. Die Ausbildung von Dornen kann als intrinsisches Merkmal von Axonen zur Herstellung eines funktionellen Gleichgewichtes gewertet werden oder sie stellen eine charakteristische Erscheinungsform geschädigter Axone dar. Dornenförmige Fortsätze an den Dendriten weisen auf ultrastruktureller Ebene eine komplexe Struktur auf (GÜRTLER 1997).

Über morphologische Strukturen axotomierter Ganglienzellen, die sich entwicklungsbedingt und regenerationsbedingt an Axonen bilden können, ist bisher wenig bekannt. Was mit diesen Fortsätzen passiert, wenn ein Funktionsgleichgewicht nicht wieder hergestellt werden kann, bleibt spekulativ. In der vorliegenden Arbeit konnten an ihnen auch keine wachstumskegeltypischen Strukturen entdeckt werden, die für die Elongation von Axonen essentiell sind. Ferner lassen die hier vorgestellten Befunde keine Systematik erkennen. Das Auftreten von Dornen wird durch die Applikation von Neurotrophen nicht signifikant beeinflusst (SAWAI et al. 1996). Es konnten in einer gequetschten Netzhaut nach sechs Monaten deutliche *spines* an axonalen Schwellungen dokumentiert werden. Auch an den intraretinalen Axonkollateralen waren Dornen ausgebildet.

Axonsprosse mit Wachstumskegeln

Ein essentielles morphologisches Merkmal für axonale Elongation ist die Ausbildung eines Wachstumskegels. Axonales Wachstum ist an diese hochsensible differenzierte Struktur gebunden. In den axotomierten Netzhäuten der vorliegenden Arbeit konnten intraretinale Wachstumskegel zehn Tage sowie zwei, drei und vier Wochen *post lesionem* licht- und erstmalig elektronenmikroskopisch gezeigt werden.

Grundsätzlich könnten nach einer Axotomie in der Netzhaut auftretende Axonsprosse entweder neugebildete intraretinale Kollateralen oder die Spitze überlebender und aus dem Sehnervstumpf in die Retina zurückgewachsene Axone repräsentieren. Die eigenen Befunde erlauben für die Mehrzahl der gefundenen Axonsprosse keinen direkten Nachweis der Herkunft, der eine lückenlose strukturelle Kontinuität mit dem Ausgangssoma oder den ursprünglichen Axonen in der NLF erfordern würde. Dennoch ist es aufgrund des hier gewählten Ansatzes der retrograden Markierung

der neugebildeten Strukturen überaus wahrscheinlich, dass die gezeigten Wachstumssprosse das Ergebnis einer intraretinalen Kollateralisierung sind (siehe Abb. 24 bis Abb. 30 und spätere Diskussion zu Axonkollateralen). Eine BDA-Markierung von Axonsprossen, die möglicherweise aus dem NO-Stumpf zurück in die Retina gewachsen sind, kann ausgeschlossen werden, da solche rekursiven Axone noch vor der Applikation des Tracers durch die unmittelbar vorhergehende NO-Axotomie (zweiter invasiver Eingriff) vom für den Transport erforderlichen Metabolismus des Zellkörpers abgeschnitten wurden. Ob im Sehnerv überhaupt Axone elongierten, wie nach NO-crush bei der Ratte gezeigt (KIERNAN 1985) und zu irgend einem Zeitpunkt nach dem NO-crush zurück in die Retina wuchsen, bleibt spekulativ, da der Sehnerv nicht untersucht wurde.

ALLCUTT et al. (1984b) fanden zehn bis fünfzehn Tage nach einem NO-crush in der Retina adulter Mäuse überlebende Axone, jedoch keine Wachstumskegel. Dieser Zeitraum korrespondiert mit dem der eigenen Untersuchungen, in denen Axonsprosse ebenfalls nicht vor dem zehnten Tag nach dem intraorbitalen NO-crush nachgewiesen wurden. McCONNELL und BERRY (1982) zeigten mittels kleiner intraretinaler Läsionen bei adulten Albinomäusen, dass die Wachstumskegel in der intraretinalen Umgebung wesentlich günstigere Wachstumsbedingungen auffinden als im myelinisierten Sehnerv. Das bemerkenswerte Wachstum von adulten RGC innerhalb der Netzhaut, wo sich kein Myelin befindet, steht im Gegensatz zur limitierten axonalen Regeneration im Sehnerv (STEVENSON 1987; CAMPBELL et al. 1999). Ursache der Wachstumsinhibition sind in erster Linie die Oligodendrozyten. Die Ausstattung des von ihnen gebildeten Myelins mit den Neuritenwachstumshemmern NI-35 und NI-250 übt einen negativen Einfluss auf die Elongation aus (SCHWAB und CARONI 1988).

CAMPBELL et al. (1999) konnten eine geringe Population an regenerierenden Axonen im myelinisierten Sehnerv nach einem NO-crush in adulten Ratten nachweisen. Sie zeigten eine enge Verbindung der regenerierenden Axone zu astrozytotischen Fortsätzen. Die funktionelle Bedeutung der Astrozyten für eine axonale Regeneration ist noch nicht endgültig geklärt. ZENG et al. (1994) konnten keinen direkten Kontakt der Axonsprosse zu den Astrozyten am zweiten Tag nach der Schnittaxotomie feststellen. Sie vermuten aber: "wenn die Astrozyten eine Rolle bei allen frühen Sprouting-Reaktionen spielen, dann ist ihre Rolle eher die Unterstützende als die Hemmende". Auch BARRON (1989) und CAMPBELL et al. (1999) diskutierten, dass Astrozyten nicht potentiell inhibitorisch wirken. Astrozyten bilden bei Reptilien und Amphibien einen Kanal, der den elongierenden Axonen als Art Leitschiene dient (RIO et al. 1989). Im Säuger-ZNS wird ihnen im juvenilen Stadium bis zum achten Tag postnatal ein permissiver Effekt zugebilligt (HALL et al. 1992, BAEHR et al. 1995). Im Riechsystem von Säugetieren können sie zeitlebens die Elongation der Riechnervenfasern unterstützen (RAISMAN 1985). Die von ihnen gebildete Astrozytennarbe nach ZNS-Verletzungen wirkt zum einen als mechanische Barriere für neuauswachsende Axone (WUJEK und REIER 1984) oder aktiviert zum anderen die physiologischen Haltemechanismen der

Axone (LIUZZI und LASEK 1987). Astrozyten können den ECM-Weg blockieren, sodass der Wachstumskegel seinen Weg nicht finden kann (McKEON et al. 1991).

Bei einer Verletzung im Gehirn oder Rückenmark kommt es zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. Die selektiv permeable Stoffwechselbarriere zwischen strömendem Blut und zentralem Nervengewebe ist unterbrochen. Die erhöhte Kapillarpermeabilität wird durch Öffnung der interendothelialen *tight junctions* hervorgerufen und führt zu einem Austritt von Plasmaproteinen. Die Schädigungsdauer der Blut-Hirn-Schranke ist vom Ort, der Größe und der Art der Läsion abhängig (NOBLE und MAXWELL 1983). Die Effekte einer Unterbrechung der Blut-Sehnerv-Schranke sind noch nicht vollständig beschrieben. Die Hauptveränderungen, die insbesondere auf den Läsionsort beschränkt bleiben, liegen in einem Verlust der Schranke 14 Tage nach der Schädigung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich der Sehnerv ähnlich wie das Gehirn und Rückenmark verhält. KIERNAN (1985) versuchte mit Hilfe von entzündungsproduzierendem Material (Eialbumin, unlösliches Trypsin) die Blut-Sehnerv-Schranke mehr als 14 Tage zu öffnen, in der Hoffnung, die axonale Regeneration zu verlängern und zu verstärken. Beides schien mit der Behandlung nicht möglich zu sein. Die Veränderung der vaskulären Permeabilität im gequetschten Sehnerv der Ratte steht im bemerkenswerten Kontrast zu der beim Goldfisch, die unter den gleichen Versuchsbedingungen stattfand (KIERNAN und CONTESTABILE 1980). In Fischen konnte eine direkte Verbindung des axonalen Wachstums zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität gezeigt werden (HEINICKE und KIERNAN 1978). Es wurde vermutet, dass die Axone aufgrund des Vorhandenseins von Plasmaproteinen aus dem Blut in der extrazellulären Flüssigkeit zur Regeneration befähigt werden. Der Wachstumskegel der regenerierenden Fischaxone nimmt die Plasmaproteine auf. Darüber hinaus wird angenommen, dass der Wachstumskegel die erhöhte Permeabilität selbst induzieren kann. Der Proteinaustausch bleibt in der Regel bei Fischen über eine lange Periode bestehen.

Auch an sympathischen noradrenergen Axonen der Hippokampusformation bei der Ratte nach einer cholinergen Denervation konnte ein bevorzugter Kontakt von wachsenden Axonen mit intrahippokampalen Blutgefäßen beobachtet werden (CRUTCHER et al. 1981). CRUTCHER et al. (1981) vermuten aber, dass andere ursächliche Faktoren daran beteiligt sind. Die Anwesenheit günstiger Substrate oder eine perivaskuläre Akkumulation trophischer Moleküle sind für axonales Wachstum relevant (CRUTCHER 1987). Inwieweit den Blutgefäßen der Blut-Sehnerv-Schranke im Bereich der Schädigungsstelle am NO oder intraretinal eine Bedeutung zukommt, lässt sich nicht mit hoher Gewissheit sagen. Jedoch konnte nach einer ÜLZ von zehn Tagen, zwei Wochen und vier Wochen eine enge Korrelation zwischen Axonsprossen und intraretinalen Blutgefäßen festgestellt werden. Für eine mutmaßliche nutritive Versorgung der Axonsprosse der ÜLZ bis zu zwei Wochen spricht die Öffnung der Blut-Sehnerv-Schranke bis zu diesem Zeitpunkt nach der Läsion (KIERNAN 1985). Dagegen spricht die Interpretation, dass sich die erhöhte Permeabilität nur auf den Läsionsort begrenzt. Nicht nur das strömende Blut kann nutritive Eigenschaften besitzen. Für

die enge Korrelation der Axonsprosse zu den Blutgefäßen könnte eine Lamininquelle funktionell wichtig sein. So beschrieben FORD-HOLEVINSKI et al. (1986) ein Lamininvorkommen an Blutgefäßen, Meningen und an Muskeln im adulten ZNS von Säugern. Auf diesem Weg könnten adhäsive Substrate wie das Laminin durchaus in der Lage sein, in unmittelbarer Nähe der Wachstumskegel ein Neuritenwachstum zu stimulieren.

Ein weiterer Befund der eigenen Arbeit war die enge Lokalisation der intraretinalen Axonsprosse zu den Axonfaszikeln. Inwieweit von den Axonen im Faszikel wachstumsfördernde Wechselwirkungen in Form von Zelladhäsion ausgehen, bleibt spekulativ. Es existiert aber ein bekanntes Erscheinungsbild aus der Embryonalperiode, in der sich elongierende Axone an bereits bestehenden Axonen orientieren und sich ihnen parallel angliedern, um das gemeinsame Zielgebiet zu erreichen (Faszikulation). Insbesondere die CAM N-Cadherin und NCAM sind bevorzugt am gesamten Axonschaft lokalisiert. Von ihnen erhalten die wachsenden Axone ihre Information (LETOURNEAU 1992). Eine wechselseitige Beeinflussung über die CAM könnte für die Navigation der Axonsprosse ebenfalls verantwortlich sein.

Ein Molekül der ECM, das im gesunden Sehnerv beim Goldfisch direkt um die Axonfaszikel lokalisiert ist und dessen Konzentration nach einer Axotomie stark ansteigt, ist das Thrombospondin. Es nimmt eine bedeutende Rolle im erfolgreichen Regenerationsprozess bei Anamnioten ein. Thrombospondin konnte im Sehnerv der Maus unter normalen Bedingungen nicht und unter geschädigten Bedingungen nur vernachlässigbar gering nachgewiesen werden (HOFFMAN und O'SHEA 1999).

Warum haben die Wachstumskegel an den Axonsprossen in der Netzhaut eine typische ovoide (Abb. 16 und Abb. 20 bis Abb. 23) bis runde (Abb. 19) Form?

Die Wachstumskegel waren vorwiegend von ovoider Gestalt und wiesen eine Größe von durchschnittlich 5 bis 10 μm in der Länge und 4 bis 6 μm in der Breite auf. Die Wachstumskegel in den Abb. 20 und Abb. 21 sind sehr groß. Die Größenangaben stimmen mit den Ergebnissen von DAVIES et al. (1996) überein. Nach einer Cingulotomie konnten sie Axonsprosse mit wachstumskegeltypischen Endauftreibungen von 10 μm dokumentieren. ZENG et al. (1994) gaben den Durchmesser der aberranten Neubildungen im proximalen Sehnervstumpf nach vollständiger Schnittaxotomie mit 2 bis 5 μm an.

Um Elongationsleistungen eines Neuriten zu ermöglichen, kann der hochdifferenzierte Wachstumskegel drei funktionelle Phasen ausbilden, die seine Gestalt beeinflussen. Dazu gehören der Vorsprung (*protrusion*), das Ausfüllen (*engorgement*) und der Zusammenschluss (*consolidation*) (GOLDBERG et al. 1992). In der Phase des Vorsprunges bewegt sich die Plasmamembran fortschreitend in Richtung des angezeigten Filopodiums. Die C-Domäne, der zentrale Teil des Wachstumskegels (BRIDGMAN 1992), wird wie ein blattähnlicher Schleier nachgezogen. Der vorspringende Schleier füllt den Raum zwischen den benachbarten Filopodien

aus. Die fortschreitende Membran, der periphere Teil des Wachstumskegels, ist flach und enthält wenige Organellen. Erst in der zweiten Phase kommt es zum Ausfüllen des Schleiers mit Zytoplasma, Membranorganellen und Mikrotubuli. Letztere erstrecken sich durch den Vorgang der Polymerisation aus der C-Domäne in die P-Domäne. Kleine Vesikel (GCV) treten zuerst ein. Dann folgen die größeren Mitochondrien. Die Membranorganellen gelangen durch den direkten Transport (entlang von Mikrotubuli) und durch die Brown'sche Molekularbewegung in die vorderen Anteile. In der dritten Phase, dem Zusammenschluss, wird die C-Domäne zylindrisch und die Bewegung der Organellen verändert sich zu einem ausschließlich bidirektionalen schnellen Transport. Nach Beendigung der drei Phasen hat sich der Wachstumskegel genau um die Länge des bestehenden Filopodiums verlängert. Der Wachstumskegel sondiert erneut sein Terrain der ECM und die Schrittfolgen beginnen erneut. Die entstandene Bewegung entspricht einem *stop and go*-Rhythmus.

Der Wachstumskegel muss jedoch diese komplexe fächerförmige Gestalt nicht immer aufweisen. Ein dokumentierbares Wachstum von Axonen mit einfach gebautem Wachstumskegel ist möglich. Besonders ausgeprägt ist die Phase des Zusammenschlusses, wohingegen sich der Vorsprung und das Ausfüllen nicht deutlich darstellen. Der scheinbar stumpf endende Wachstumskegel konnte bei extrem schnell wachsenden sympathischen Axonen *in vitro* bei der Ratte nachgewiesen werden (KLEITMAN und JOHNSON 1989). Die Wachstumskegel in diesen Versuchen besaßen ein breites Lamellipodium ohne Filopodien. Ein weiteres Beispiel von einfachen Wachstumskegeln besteht bei elongierenden Axonen *in vivo*, die sich an bereits gebildeten Fasertrakten orientieren (TOSNEY und LANDMESSER 1985). *In vivo*-Studien im sich entwickelnden visuellen System demonstrierten, dass die Wachstumskegel deutlichen morphologischen Veränderungen unterliegen, wenn sie sich an sogenannten Entscheidungsorten, wie dem *Chiasma opticum*, befinden (GODEMENT et al. 1994). Die ovoide bis runde Gestalt der intraretinalen Wachstumskegel in den eigenen Untersuchungen könnte auf zwei grundlegenden Mechanismen basieren. Sie befanden sich erstens in einer schnellen Bewegungsphase. Im Hinblick auf das existierende Degenerationsgeschehen in der Netzhaut ist diese Option eher unwahrscheinlich. Sie ähnelten zweitens den kollabierten Neuriten nach einer Behandlung mit Collapsin (LUO et al. 1993) oder Cytochalasin (YAMADA et al. 1971). Die dokumentierten intraretinalen Axonsprosse sind mit ihren Wachstumskegeln eventuell aufgrund einer versiegenden trophischen Quelle in der Retina oder infolge einer Abnahme des Rezeptorgehalts im Wachstumskegel zu elongationsinaktiven Strukturen geworden (siehe Abschnitt 4.3). Der Wachstumskegel mit einer ÜLZ von zehn Tagen (Abb. 17) wies zwei Filopodien an seinem apikalen Pol auf. Er konnte auch im Gegensatz zu den anderen Wachstumskegeln in der IPL dokumentiert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass er zu weiteren Elongationsleistungen fähig war.

In den axotomierten Netzhäuten waren zu den ÜLZ von zehn Tagen nach dem NO-crush erstmalig die Axonsprosse analysierbar. Zu einem früheren Zeitpunkt von drei Tagen konnten sie nicht nachgewiesen werden. Es kommt aber schon 24 bis 48 Stunden nach der Schädigung zur

Bildung von Axonsprossen, wie die Arbeitsgruppe um ZENG et al. (1994) bei adulten Albinoratten dokumentierte. Die Arbeitsgruppe durchtrennte den NO 2,0 bis 2,5 mm distal des *Bulbus oculi* durch eine Schnittaxotomie und beschrieb die folgenden Veränderungen im proximalen Stumpf und am Läsionsort. RICHARDSON et al. (1982a) dokumentierten die Axonsprosse auf ultrastruktureller Ebene, die sich zwei Wochen nach einer Durchtrennung des NO zwischen dem *Foramen opticum* und dem *Chiasma opticum* darstellten.

In den eigenen Untersuchungen wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen und Schnittbildserien der lichtmikroskopische Befund der intraretinalen Wachstumskegel erstmalig verifiziert.

Das primäre Ziel der ultrastrukturellen Untersuchung war das Auffinden der im Lichtmikroskop gesehenen Neubildungen. Es musste zweifelsfrei gezeigt werden, ob die aberranten Fortsätze tatsächlich intraretinal endeten. Erst dadurch war es möglich, ihre regenerativen Eigenschaften im etablierten Retinagewebe zu beweisen.

Die Wachstumskegel der eigenen Untersuchungen waren durch eine Vielzahl an Mitochondrien und unterschiedlich großen Vesikeln gekennzeichnet. Es konnte zu allen vier ÜLZ ein unterschiedlicher Gehalt an Mitochondrien und GCV in den Wachstumskegeln nachgewiesen werden. Sowohl in der C-Domäne als auch in der P-Domäne ließen sich zahlreiche Mitochondrien und GCV dokumentieren. BRIDGMAN und DAILEY (1989) stellten dagegen im Wachstumskegel eine Akkumulation der vesikulären Strukturen bevorzugt in der C-Domäne von zervikalen Ganglienneuronen bei der Ratte *in vitro* fest.

Die Mitochondrien waren vor allem in den Wachstumskegeln nach zweiwöchigen ÜLZ genau zu analysieren. An ihnen konnten die Cristae, der Intracristaeraum und die zentral liegende Matrix gut differenziert werden. Die Mitochondrien hatten zu allen ÜLZ ein normales Erscheinungsbild.

Die GCV bildeten in der C-Domäne der Wachstumskegel ein charakteristisches Membrankompartiment. Sie befanden sich in Gruppenformation oder als Einzelstruktur eingebettet in das DAB-Präzipitat zwischen den Mitochondrien. Eine häufig beschriebene Lokalisation unmittelbar unter dem Plasmalemm (YAMADA et al. 1971; BUNGE 1973; PFENNIGER 1979) wurde in den eigenen Untersuchungen nicht dokumentiert. GCV übernehmen funktionell die Bildung des Plasmalemm. Die Fusion der GCV mit dem Plasmalemm erfolgt in einem komplexen Ablauf unterschiedlicher molekularbiologischer Mechanismen (PFENNIGER et al. 1992). Eine durchschnittliche Geschwindigkeit der plasmalemmlen Expansion bei Säugerneuronen wurde mit ungefähr 0,5 bis 1,0 $\mu\text{m}^2/\text{min}$ angegeben (PFENNIGER und MAYLIÉ-PFENNIGER 1981).

In der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund der BDA-Markierung Anteile des wachstumskegeltypischen Zytoskeletts in Form von Mikrotubuli, Neurofilamenten oder Mikrofilamenten nicht erfasst werden. BDA als zytoplasmatischer Tracer füllte den gesamten axoplasmatischen Raum aus

und überdeckte die zytoskelettalen Strukturen. Axonale Elongation ist zum einen abhängig von der Existenz der Mikrotubuli, die Stabilisierungs- und Transportfunktionen übernehmen, zum anderen von der Existenz der Neuro- und Mikrofilamente, die die strukturelle Integrität erhalten und die Bewegung des Wachstumskegels ermöglichen (YAMADA et al. 1970, 1971; BUNGE 1973).

Ein weiterer ultrastruktureller Befund in einer axotomierten Netzhaut war das vermehrte Auftreten von MGZ. Aufgrund ihrer phagozytotischen Funktion wurden aktivierte MGZ transzellulär markiert. Sie konnten bevorzugt in der Nähe von degenerierenden Perikarya beobachtet werden, die sie mit ihren Fortsätzen eng umschlungen. An den Axonsprossen selbst waren sie nicht lokalisiert.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ein temporär begrenztes Regenerationsmuster. Die Axonsprosse waren zehn Tage nach der Durchtrennung in der Netzhaut erkennbar. Zu einer postoperativen ÜLZ von drei Tagen konnten sie noch nicht detektiert werden. Vermutlich benötigen die überlebenden Neurone einen definierten Zeitraum, um ihren Zellmetabolismus auf regenerative Leistungen zu adaptieren. Nach ÜLZ von zwei, drei und vier Wochen waren die Axonsprosse weiterhin sichtbar und konnten mit ihren Wachstumskegeln erstmalig ultrastrukturell analysiert werden. Acht Wochen nach der Axotomie konnten keine adäquaten Strukturen mehr ausfindig gemacht werden. Das Ergebnis stimmt mit den Befunden von ZENG et al. (1994) überein. Sie geben an, dass sich die Axonsprosse im proximalen Sehnervstumpf schon nach zwei Wochen merklich reduzierten und in der achten Woche verschwunden waren. Auch RICHARDSON et al. (1982a) geben eine ÜLZ der Axonsprosse im proximalen Sehnervstumpf von acht Wochen an, in denen sich die aberranten Fortsätze nach einer intrakranialen Axotomie zurückbildeten.

Eine Ursache für das abortive Regenerationsverhalten retinaler Ganglienzellen nach ÜLZ von zehn Tagen bis vier Wochen *post lesionem* könnte ein Ungleichgewicht zwischen wachstumsfördernden und -hemmenden Einflussfaktoren sein (siehe Abschnitt 5.3).

Axonkollateralen

Auch unter physiologischen Bedingungen können axonale Verzweigungen im ZNS auftreten. So sind z.B. die Pyramidenzellen des Kortex (ZHANG und DESCHÊNES 1997), die Purkinje-Zellen des Cerebellums, wie auch die Horizontal- und Marginalzellen des *Colliculus superior* (LANGER und LUND 1974) für ihre axonalen Kollateralisierungen bekannt. Auch Axone der RGC können im ungeschädigten *Tractus opticus* axonale Kollateralen ausbilden. Mit diesen Aufzweigungen projizieren sie in unterschiedliche Zielgebiete (SEFTON 1968). In der gesunden Säugernetzhaut sind unter physiologischen Bedingungen Axonkollateralen jedoch nicht oder kaum vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Formen von intraretinalen Axonkollateralen in einer axotomierten Netzhaut dokumentiert werden. Es handelt sich um einen einmaligen Befund einer

axonalen Aufzweigung in unmittelbarer Nähe des Axonhügels aus einem dreiwöchigen Versuch. Diese Kollaterale wies keine weiteren Abzweigungen auf. Ausgangspunkt war eine RGC mit mittelgroßem ovoiden Soma und gerade verlaufenden spärlich sich verzweigenden Dendriten. Entsprechend der Zellklassifizierung der RGC nach morphologischen Gesichtspunkten (BOYCOTT und WÄSSLE 1974; PERRY 1979) wurde die Zelle dem Typ-III nach PERRY (1979) oder einer α -Zelle nach BOYCOTT und WÄSSLE (1974) zugeordnet. Die nur schwach mit BDA markierte Kollaterale zweigte sich nach 10 μ m vom Axonhügel ab und zog in die entgegengesetzte Richtung zum *Discus nervi optici*. Das Ende der Kollaterale war im Durchmesser gleichbleibend. Es ist wahrscheinlich, dass das retrograd über das Ursprungssaxon transportierte BDA zuerst das deutlich markierte Perikaryon und anschließend auf anterogradem Weg die Kollaterale anfüllte. Es ist möglich, dass die Gesamtheit der Kollaterale aufgrund ungenügender Markierung nicht erfasst werden konnte. Diese Kollateralenform konnte in nicht geschädigten Netzhäuten von adulten Affen und Katzen (USAI et al. 1991) dokumentiert werden. Die von USAI et al. (1991) systematisierten Ganglienzellen mit verzweigten Axonen wurden an zwei Zellen in sieben Netzhäuten von Affen und an einer Zelle in acht Netzhäuten von Katzen gefunden. Auch in den vorliegenden Untersuchungen war die Kollateralisierung nach einer intraorbitalen Quetschung bei 34 Ratten nur an einer Zelle sichtbar.

THANOS (1988b) konnte an einer DiI-markierten Typ-III-RGC eine axonale Aufzweigung in der ungeschädigten Retina einer Albinoratte darstellen. Die Axone der Typ-III-Zellen zeichnen sich neben ihrer Kollateralisierung auch durch ihre Herkunft aus. Sie entspringen aus einem Primärdendriten und werden als Dendraxon bezeichnet (BOYCOTT und WÄSSLE 1974). Die Aufzweigung in der Studie von THANOS (1988b) fand in einer Distanz von 200 μ m vom Perikaryon statt. Im Gegensatz zur Axonkollaterale der Typ-III-RGC in den eigenen Versuchen war der Durchmesser der Axonverzweigungen konstant. Die Kollaterale der Abb. 30 reduziert ihren Durchmesser um die Hälfte des Ursprungsassons.

Eine weitere, den bereits beschriebenen Kollateralen ähnliche Aufzweigung wurde an LY-gefüllten Ganglienzellen von PEICHL (1989) beobachtet. PEICHL (1989) definierte Typ-I-Zellen entsprechend ihres dendritischen Terminationsmusters in der IPL. Er unterteilte die größten RGC in α - und in β -Zellen, wobei er an diesen zwei Zelltypen je eine axonale Kollateralisierung fand. Da sich die Axone mit LY nur über eine Länge von wenigen 100 μ m markierten, ist es fraglich, ob beide Verzweigungen durch die *Lamina cribosa sclerae* in den NO eintreten.

Nach einer intravitrealen Implantation eines Segments aus dem PNS bei gleichzeitigem NO-crush ließen sich an den RGC des adulten Goldhamsters *axon-like processes* nachweisen (LEI et al. 1995). Die *axon-like processes* entsprangen in einer Distanz von bis zu 150 μ m vom Axonhügel des Ursprungsassons und tendierten zur Ausbildung von Schleifen.

Eine andere Kollateralisierungsform der eigenen Arbeit ließ sich durch drei Merkmale von der

eben beschriebenen Form differenzieren. Die Kollateralen zogen aus einem im Faszikel befindlichen Axon, besaßen viele Verzweigungen und wiesen eine komplexe Termination auf. Eine Zugehörigkeit zur Ursprungszelle konnte hier nicht gefunden werden. Insbesondere die Axonkollateralen aus den zweiwöchigen Versuchen bildeten in ihrem Verlauf Kurven und besaßen viele Kollateralzweige. Die zweiwöchigen Axonkollateralen zogen in die IPL, in der sie mit einer komplizierten Terminationsstruktur ihren Verlauf beendeten. Die Axonkollateralen der Rattenretinae der vorliegenden Arbeit ähneln den beschriebenen Axonkollateralen von DACEY (1985). Er untersuchte die Axone der nicht geschädigten Ganglienzellen bei der adulten Katze in einer HRP-Studie. Die Axone zeichneten sich u.a. durch eine starke Verzweigung aus, die einen ausgedehnten Netzhautbereich umfasste und in der IPL endete. Die verwendete Meerrettichperoxidase wurde mit einem Kobalt-verstärkenden DAB (ADAMS 1977) sichtbar gemacht, was zu bemerkenswert dunkel markierten Nervenfasern führte. Die auch als intraretinale terminale Axone bezeichneten Fortsätze erschienen lang und gerade und wiesen einen Durchmesser von ungefähr 1 µm auf. Sie waren in den peripheren und zentralen Anteilen der Retina gleichermaßen lokalisiert. Die Länge der intraretinalen terminalen Axone variierte zwischen 500 µm und 8 mm, im Durchschnitt waren sie ca. 2 mm lang. Ihr Terminationsort in der IPL wies Unterschiede auf. So konnten diese Axone im inneren Anteil der IPL enden sowie einen schrägen Verlauf durch die gesamte IPL haben. Wie die Kollateralen der eigenen Befunde enden die Terminalaxone von DACEY (1985) übereinstimmend in einer unregelmäßigen Schwellung (*terminal cluster*). DACEY (1985) vermutete, dass die Terminalschwellungen in der IPL mit den bipolaren Zellen, den Amakrinen Zellen und/oder den Ganglienzellen direkte synaptische Kontakte eingehen. Durch die weitverzweigte horizontale Anordnung der Kollateralen in der IPL kommt es zur lateralen Weiterleitung von Aktionspotentialen.

Aufzweigungen an Axonen der IPL der ungeschädigten Retina wurden schon frühzeitig im silberimprägnierten Gewebe von Hunden, Affen, Menschen und Katzen beobachtet. GALLEGO und CRUZ (1965) beschrieben in der nicht geschädigten Netzhaut axonale Kollateralisierungen beim Hund und beim Menschen, die sich über eine Länge von 0,5 bis 5 mm in der IPL verzweigten. Die Axonkollateralen hatten ihren Ursprung in den Neuronen der GCL. Die Ganglienzellen schienen kein Axon in der NFL zu besitzen und wurden als Verbindungsganglienzellen (*association ganglion cells*) bezeichnet. Unter Berücksichtigung der aktuellen Erkenntnisse lassen sich die Neurone der GCL in zwei Populationen unterteilen. Es befinden sich in der Schicht Neurone, die ein Axon im Sehnerv besitzen, die RGC und die verlagerten Amakrinen Zellen (DAC). Wahrscheinlich entsprechen die „Verbindungsganglienzellen“ von GALLEGO und CRUZ (1965) in Wirklichkeit DAC, deren lange multiple Fortsätze vom dendritischen Kompartiment stammen, oder es handelt sich um RGC, deren Hauptaxon Richtung *Discus nervi optici* nicht markiert wurde.

In menschlichen Netzhäuten wurden nach einer Markierung von über 1000 Ganglienzellen mit HRP oder Neurobiotin in einer *whole-mount*-Präparation *in vitro* 19 intraretinale Axonkollateralen

qualitativ und quantitativ analysiert (PETERSON und DACEY 1998). Intraretinale Axonkollateralen sind an eine spezifische Ganglienzellart gebunden und konnten wie beschrieben bei Affen (USAI et al. 1991) und Katzen (DACEY 1985) dokumentiert werden. Es ist anzunehmen, dass die Bildung der Axonkollateralen bei bestimmten RGC-Typen bei allen Wirbeltieren möglich ist. Den Axonkollateralen wurden in erster Linie synaptische Kontakte in der IPL zuerkannt.

Die Untergliederung der Kollateralen in zwei Formen, wie sie in der vorliegenden Arbeit erfolgte, steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen an einer Affenretina (USAI et al. 1991). Die erste von den Autoren aufgeführte Population entspricht der in Abb. 31 dargestellten Zelle. Ganglienzellen, die dieser Form zugeordnet wurden, hatten ein mittelgroßes Soma mit geraden, selten verzweigten Dendriten und zogen mit ihren afferenten Fasern in die IPL. Das Hauptaxon maß im Durchmesser ca. $0,6\text{ }\mu\text{m}$ und verlief entlang von Axonfaszikeln. Es verließ die Netzhaut im Bereich des *Discus nervi optici*. Die Kollaterale zog hauptsächlich in die IPL. Die zweite Population der Fortsätze besteht aus sehr dicken Fasern ($2,1\text{ }\mu\text{m}$) und scheint vom *Discus nervi optici* zu kommen. Der Hauptzweig zog horizontal zwischen NFL und GCL und gab orthogonal Sekundärzweige ab. Die Sekundärzweige durchzogen vertikal die GCL und traten in die IPL unter Abgabe weiterer Kollateralen ein (USAI et al. 1991).

USAI et al. (1991) mutmaßten eine funktionelle Rolle als intraretinales Feuersynchronisationssystem oder sie stellen ein Residuum aus der retinalen Entwicklung dar (RAMOA et al. 1987). Es sind ähnliche weitreichende Axonkollateralen beschrieben worden, die den zentrifugalen Fasertrakten zugeordnet werden können. Diese Nervenfasern ziehen aus dem Gehirn in die Retina. Sie wurden bei Vögeln (COWAN und POWELL 1963), beim Goldfisch (SPRINGER 1983) und bei der Ratte (ITAYA und ITAYA 1985) nachgewiesen. Die funktionelle Bedeutung des zentrifugalen Axonsystems in der Retina ist unklar. Zum einen könnte das Erregungspotential erhöht werden (MILES 1972) oder das System unterstützt zum anderen das frühzeitige Ermitteln visueller Zielzellen (ROGERS und MILES 1972).

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Axotomie zwei Formen intraretinaler Axonkollateralen beschrieben. Sie konnten nur in den BDA-markierten geschädigten Rattenretinae gefunden werden. In den DiI-markierten Kontrollen waren sie nicht zu sehen. Auch die Kollateralen zeigten Anzeichen von Degenerationsprozessen durch das Auftreten von Schwellungen. Sie könnten sich aber auch postmortal oder präparationsbedingt entwickelt haben. Die dokumentierte Kollaterale nach acht Wochen befand sich bereits in einem Zustand fortgeschrittener Degeneration.

Interessant wäre es, die Terminationsstrukturen in der IPL näher zu untersuchen. Um die funktionelle Rolle dieser Strukturen, die synaptische Kontakte oder Wachstumskegel sein könnten, zu definieren, müssten immunhistochemische Darstellungen genutzt werden.

Schleifenaxone

Einen sehr ungewöhnlichen Verlauf zeigten zwei intraretinale Axone nach einer zwei- bzw. dreiwöchigen ÜLZ. Die Axone wiesen einen schleifenförmigen Verlauf auf. Auf ihren Wegen zogen sie ziellos umher und besaßen ausgeprägte Schwellungen. Das Aufsuchen der zugehörigen Ganglienzellen zu diesen erratischen Neuriten erwies sich als schwierig, da sie aus einem Faszikel abbogen. Ob es sich um einen Anfangsteil (perikaryonah) oder um den Endteil des Axons (diskusnah) handelte, bleibt offen. In einigen Wirbeltieren existiert eine Unterpopulation an Ganglienzellen, deren Axone nicht auf direktem Weg zum *Discus nervi optici* elongieren. Sie ziehen zunächst zirkumferentiell und bewegen sich später zum *Discus nervi optici* (COOK 1982). SPRINGER et al. (1989) konnten eine kleine Gruppe an RGC in der ventronasalen und ventrotemporalen Netzhaut des Goldfisches mit adäquatem Verlauf dokumentieren. Die Axone der RGC verliefen dorsal und parallel zum Rand der Retina. Nach dem Erreichen der Grenze zwischen dorsaler und ventraler Netzhaut bogen die zirkumferentiellen Nervenfasern um und schlossen sich den radiär orientierten Axonfaszikeln an und passierten in gebündelter Formation den *Discus nervi optici*. Die Axone verliefen entweder zwischen der NFL und der GCL oder erstreckten sich zwischen der GCL und der IPL. SPRINGER et al. (1989) konnten weiterhin die Somata der zirkumferentiellen Axone beim Goldfisch identifizieren und stellten eine Verlagerung in die Nähe der IPL fest. Sie gehörten nicht zur Population der DAC. Die Ursache der aberranten axonalen Trajektorie kann in einer geringen Abweichung des Neuronenstandortes liegen. Es werden aber auch molekulare Faktoren an der dorsoventralen Netzhautgrenze für den erratischen Verlauf der Axone diskutiert. THANOS et al. (1991) fanden diese morphologische Erscheinungsform an den initialen Axonsegmenten der *giant-parasol-like cells* einer nicht geschädigten humanen Retina. Die Axone zogen anfänglich in Richtung Peripherie, drehten um 180° und verließen die Retina über den *Discus nervi optici*. Diese Zellen sind vermutlich Überreste von Ganglienzellen, deren axonaler Verlauf in der Embryonalperiode entstanden ist. Frühere Untersuchungen an Retinae bestätigten die Befunde (MAFFEI und PERRY 1988). In *whole-mount*-Retinae von Katze, Ratte und Affe, die sich retrograd mit HRP markiert hatten, wurden quantitative Analysen des initialen Axonsegmentes in Beziehung zum *Discus nervi optici* durchgeführt. Es konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine plausible Erklärung für diese Axone gefunden werden. Da es eine Signifikanz zwischen dem Auftreten der erratischen Axonverläufe mit dem Überleben der Zellen zu geben scheint, sind die Zellen eventuell in der Lage, zu anderen Zielzentren synaptische Kontakte einzugehen, indem sie ihr Axon in topographisch geeignete Gebiete wieder entsenden (THANOS et al. 1991).

5.3 Warum sind zentrale Nervenzellen nur zu einer temporären Regeneration befähigt?

Die in dieser Arbeit gezeigten Axonsprosse mit einfach gebautem Wachstumskegel können als abortiver Regenerationsversuch von RGC auf eine irreversible Unterbrechung des Kontaktes zu ihren Zielzellen interpretiert werden. Unter einer abortiven Regeneration versteht man regenerative Leistungen der überlebenden Zelle in einem zeitlich reduzierten Umfang.

Mit dem erstmalig ultrastrukturellen Nachweis von intraretinalen Wachstumskegeln konnten in der NFL der adulten Rattenretina Umstrukturierungsprozesse nach Unterbrechung der Ganglienzellaxone (intraorbitale Quetschung) dargestellt werden. Retinale Ganglienzellen sind also nach einer Schädigung ihrer Nervenfasern in der Lage, selbstständig ohne den Einfluss neuroprotektiver Maßnahmen mit einer Reorganisation auf axonaler Ebene zu reagieren. Sie bilden intraretinale Wachstumskegel aus, die vermutlich neue Innervationsziele in der Retina aufsuchen, würden sie nicht nach vier Wochen der progressiven Degeneration unterliegen. Funktionell gesehen können intraretinale synaptische Kontakte nur in einer Sackgasse enden, jedoch für ein Überleben der Einzelzelle wiederum essentiell sein.

Der Kernpunkt von Regenerationen im adulten ZNS von Säugern und Vögeln besteht im komplizierten Wechselspiel zwischen intrinsischen und extrinsischen Faktoren, die das Schicksal der jeweiligen Nervenzelle bestimmen (SO und YIP 1998). Die intrinsischen Faktoren werden durch die Nervenzelle und ihre entsprechenden Leistungen selbst, die extrinsischen Faktoren von der unmittelbaren Umgebung vermittelt. Basierend auf der grundsätzlichen Fähigkeit zur Regeneration befindet sich das intrinsische Milieu von zentralen Nervenzellen zum extrinsischen Milieu in einem Gleichgewicht. Herrscht ein Ungleichgewicht zwischen beiden Einflüssen, so versiegt das Regenerationspotential. Es ist auch davon auszugehen, dass die Faktoren nicht unabhängig voneinander entstehen, sondern dass sie sich gegenseitig bedingen. Durch das Überwiegen oder Versagen eines Faktors wird der andere unmittelbar beeinflusst. So ist zum Beispiel die Ausbildung eines Wachstumskegels am Axon nicht nur auf das Vorhandensein und die Bereitstellung von Membrankomponenten durch die Nervenzelle zurückzuführen, sondern es müssen auch in der Umgebung des neuen Wachstumskegels Signale vorhanden sein, die diese Transformation fördern. Es sind in erster Linie die ECM-Moleküle und die CAM zu nennen, ohne deren Anwesenheit keine attraktiven bzw. repulsiven Kräfte auf den elongationsfähigen Wachstumskegel wirken können. Für ein Neuron ist der Übergang aus der nichtelongierenden in eine elongierende Phase eine beachtliche Leistung. Die Bereitstellung von Membrankomponenten wird vom Hauptsyntheseort, dem Zellkörper, übernommen. Er besitzt eine präzise Ausstattung an baustoffproduzierenden Zellorganellen wie dem Zellkern, dem Golgi-Apparat und dem rER. Nach Axotomie kommt es zu einem Anstieg der metabolischen Stoffwechselleistungen. Der Gesamtmetabolismus der axonalen Proteine verändert sich aus der *steady state*, in der die

Gesamtmenge der Proteine konstant blieb, in eine neue Phase, die durch einen Anstieg der Proteine in ihrer Gesamtmenge charakterisiert ist (LASEK und KATZ 1987). Es müssen Rezeptoren bereitgestellt werden, die über spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen dem Wachstumskegel Orientierungsfähigkeiten verleihen. Außerdem ist die Bildung von Membran- und Zytoskelettproteinen wichtig (LASEK und BRADY 1982). Die Zytoskelettproteine sind für die Stabilisierung und Beweglichkeit (BRIDGMAN 1992), die Membranproteine für die plasmalemmale Expansion des Axons verantwortlich (LETOURNEAU 1992; PFENNIGER et al. 1992). Es werden im geschädigten Neuron nicht nur Baustoffe geliefert. Ferner steuert das Neuron aus eigenem Antrieb axonales Wachstum. Es existieren Polypeptide, die ausschließlich im Zusammenhang mit axonalem Wachstum stehen. Unter den *growth associated proteins* kommt dem GAP-43 die größte Bedeutung zu (SKENE und WILLARD 1981). Es wird angenommen, dass diese Proteine die neuronalen Reaktionen auf extrazelluläre Signale durch den Einfluss auf das intrazelluläre Signalsystem verändern können (SKENE 1989). Der wachstumsbezogene Anstieg von GAP-43 korreliert mit dem Anstieg der Syntheserate im Zellkörper (SKENE und WILLARD 1981). Der Regulationsort der Synthese von GAP-43 (Transkription, Translation, posttranslationelle Prozesse) ist noch nicht exakt nachgewiesen worden. Gleichbedeutend mit seiner möglichen Rolle im Zusammenhang mit axonaler Regeneration verkörpert GAP-43 eine Proteinkomponente in der Membran von Wachstumskegeln und nimmt 1 % des Gesamtproteingehaltes des Wachstumskegels ein (SKENE et al. 1986). Auch in den Schwellungen, die sich auf der gesamten Länge eines regenerierenden Axons formieren, konnte eine hohe GAP-43-Konzentration gemessen werden. SKENE et al. (1986) spekulierten, dass es in den Wachstumskegeln von geschädigten Axonen im reifen Säuger-ZNS zu einem Defizit an GAP-43 kommt.

Ein zweites potentes Protein, das von geschädigten Neuronen gebildet wird, ist das C-Jun. C-Jun gehört zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren (TF). Die TF überwachen den Vorgang der Transkription, also die Biosynthese der RNA, durch den codogenen Strang (Matrize) der DNA (KARLSON 1988, S. 121). Da Transkriptions- und Translationsprozesse durch ihre Synthese von mRNA und Proteinen ein wichtiger Schritt für Regenerationsentwicklungen der Axone sind, haben die TF mit ihren regulatorischen Eigenschaften eine nicht zu unterschätzende Wirkung. Nach einer Axotomie des NO wird durch eine Vielzahl von RGC C-Jun exprimiert (HERDEGEN et al. 1993). Es wird vermutet, dass eine lang andauernde C-Jun-Expression axonale Sprouting-Prozesse induzieren kann.

Solange der Zellkörper zu den beschriebenen Syntheseleistungen fähig ist, ist es für ihn von großer Bedeutung, weiterhin von seiner unmittelbaren Umgebung unterstützt zu werden. Das ausgereifte ZNS verfügt über beträchtliche regenerationspermissive Kapazitäten, z.B. über einen Gehalt an humoralen neuritenfördernden Faktoren (*neurite-promoting factors*, NPF). Humorale NPF sind lösliche Moleküle, die spezifisch die Elongation von Neuriten stimulieren. Ein allgemein bekanntes Beispiel für NPF ist NGF selbst (VARON et al. 1983). NGF, 1950 erstmalig

beschrieben, verkörpert den Protagonisten im NTF-Konzept (LEVI-MONTALCINI 1987; KORSCHING 1993). NGF reguliert das Überleben, das Neuritenwachstum und die Neurotransmitterproduktion. NGF wird von den Zielzellen gebildet, spezifisch gebunden, von der Terminationsstruktur der sympathischen Nerven internalisiert und via schnellem retrograden Transport zum Zellsoma befördert (LEVI-MONTALCINI 1987; THOENEN et al. 1987).

Das NTF-Konzept (KORSCHING 1993) basiert nicht nur auf dem klassischen Fall, dass die Zielzellen einer bestimmten Population neurotrophe Faktoren synthetisieren. Das Modell wurde am Fall des NGF und seiner Bedeutung für sensorische und sympathische Neurone entwickelt (LEVI-MONTALCINI 1987). Neben diesem Modell existieren drei andere nichtklassische Mechanismen, um die Überlebensfähigkeit von Neuronenpopulationen durch die Wirkung neurotropher Faktoren zu induzieren. Der anterograde Mechanismus besagt, dass Zellen auch von ihren afferenten Inputs abhängig sein können. Das gilt eventuell für den Wachstumsfaktor bFGF. HAGEMANN et al. (1991) gelang es im Falle der RGC die Synthese und Freisetzung von bFGF zu zeigen. FERGUSON et al. (1990) machten Versuche mit exogen zugeführtem bFGF, der von den RGC-Axonon aufgenommen und über den schnellen anterograden Transport zum Colliculus superior transportiert wurde. Auch den axonumhüllenden Gliazellen kommt bei der indirekten Vermittlung eine Bedeutung zu. Gliazellen sind bekannt für ihre Synthese von neurotrophen Faktoren. In einigen Fällen vermitteln sie die neurotrophe Wirkung von bFGF (ENGELE und BOHN 1991). Der bFGF erhöht die NGF-Freisetzung aus Astrozyten (YOSHIDA und GAGE 1991). Der letzte nichtklassische Fall ist die autokrine Wirkung. Die Neurone können den neurotrophen Faktor nicht nur selbst synthetisieren, sondern auch den entsprechenden Rezeptor exprimieren. So sind sie fähig, ihren eigenen Faktor zu binden. Als Beispiel seien hier die hippokampalen Pyramidenzellen genannt, die BDNF und seinen spezifischen Rezeptor bilden können (SCHECTERSON und BOTHWELL 1992). Die Neurotrophine NGF, BDNF, Neutrophin-3 und Neurotrophin-4 besitzen eine große Bedeutung in der Entwicklung und Regeneration von neuronalen Kreisläufen im visuellen System von Wirbeltieren, wie VON BARTHELD (1998) bei Vögeln ermitteln konnte. MEY (1994) gelang es, mit der *in vivo*-Applikation von neurotrophen Faktoren den Regenerationsprozess von RGC der durch Axotomie geschädigten Netzhaut zu verzögern. Eine zwei- bis dreifach höhere Anzahl von Neuronen überlebte im Gegensatz zu den Kontrolltieren. MEY (1994) konnte adäquate Effekte durch Einsatz von BDNF und CTNF erzielen. Die Forschung der letzten zwanzig Jahre hat angezeigt, dass die Neurotrophine und ihre Rezeptoren in zahlreichen visuellen Zentren, von der Retina bis zum visuellen Kortex, lokalisiert sind. Die Neurotrophine besitzen einen bemerkenswerten Einfluss auf die Proliferation, das Neuritenwachstum und das Überleben der Zellen im visuellen System *in vivo* und *in vitro*. Neben der Funktion der Neurotrophine als retrograde, von den Zielzellen gebildete trophische Faktoren zeigen neueste Ergebnisse, dass die Neurotrophine auch auf anterogradem-afferenten Inputweg sowie durch autokrine lokale Wirkungen in der Retina, im Sehnerv und im visuellen Kortex Effekte erzielen können.

CAMINOS et al. (1999) analysierten mittels Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung die Fischnetzhaut von ungeschädigten und von durch NO-crush geschädigten Schleien. Sie versuchten, Aufschluss über die Verteilung von Neurotrophen und von ihren Rezeptoren zu erhalten. Tyrosinkinaserzeptoren waren überwiegend in der IPL und in der Ganglienzellschicht vorhanden. Eine NGF-Immunreaktion konnte ausschließlich in den Fortsätzen der MÜLLER-Zellen detektiert werden, wobei BDNF in den neuronalen Somata und in den MÜLLER-Zellen auftrat. Neurotrophin-3 wurde in vielen Zellkernen und Neurotrophin-4/5 in Nervenfasern und in Zellen der inneren Retina gefunden. Während der axonalen Regeneration konnte ein starker Anstieg der Tyrosinkinase A und der mRNA in der Ganglienzellschicht nachgewiesen werden, der 30 Tage nach der intraorbitalen Schädigung einen Gipfel aufwies. Vom 30. bis zum 90. Tag postoperativ normalisierte sich der Wert, da bei Fischen funktionelle Regenerationen möglich sind. Die heterogene Verteilung der Neurotrophin- und Rezeptorenmuster in einer regenerationsfähigen Fischnetzhaut, ihre Unterschiede zu anderen Tierarten und die Veränderungen der Tyrosinkinase A machen auf eine zentrale Funktion der Moleküle während regenerativer Prozesse aufmerksam.

Die Befunde von VON BARTHELD (1989) bei Vögeln und von CAMINOS et al. (1999) bei Schleien unterstützen die Vermutung, dass der Retina und dem Sehnerv mit ihrer molekularen Ausstattung an neurotrophen Faktoren eine große Bedeutung bei regenerativen Prozessen zukommt. Das temporäre Regenerationsverhalten der RGC auf die Quetschung könnte drei Ursachen haben:

- Die neurotrophen Faktoren in der Retina und im Sehnerv sind nur begrenzt vorhanden und ihre Quelle versiegt.
- Der Wachstumskegel an den Axonsprossen stellt die Expression von Rezeptoren in seiner Membran ein.
- Die intrinsische Produktion von GAP-43- und die C-Jun-Expression können vom Neuron nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Kenntnisse über intrinsische Umstrukturierungsprozesse an den Axonen adulter RGC können eine Bedeutung für die Behandlung degenerativer retinaler Erkrankungen und nach Sehnervschädigungen erlangen.

Hauptstrategien im Hinblick auf die axonale Regeneration im ZNS sollten die Inhibition der unvorteilhaften und die Aktivierung der vorteilhaften Faktoren in Kombination mit der Stimulation intrinsischer Fähigkeiten zentraler Nervenzellen sein. Basierend auf den aktuellsten Berichterstattungen aus verschiedenen Bereichen der Biotechnologie wird die weitere Erforschung von embryonalen und adulten Stammzellen zur Behandlung abgestorbener zentraler Nervenzellen von nicht zu unterschätzender Bedeutung werden.

6 Zusammenfassung

Hoffmann, Anke

Qualitative Analyse der retinalen Nervenfaserschicht nach Durchtrennung des *Nervus opticus* der adulten Albinoratte: Ultrastruktureller Nachweis von intraretinalen Wachstumskegeln

Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Veterinär-Anatomisches Institut

128 Seiten, 42 Abb., 1 Tab., 342 Lit.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach einer irreversiblen Schädigung des Sehnervs zu zeigen, ob retinale Ganglienzellen zu Umstrukturierungsprozessen an ihren Axonen ohne neuroprotektive Unterstützung fähig sind. Das besondere Interesse galt der licht- und elektronenmikroskopischen Analyse.

Verwendet wurden 37 adulte Albinoratten (WISTAR-Prob). Zuerst wurde der *Nervus opticus* für 30 s 5 mm hinter dem *Bulbus oculi* gequetscht. Ein zweiter invasiver Eingriff, der zur retrograden Markierung von aberranten Neubildungen an den Axonen der Nervenfaserschicht durchgeführt wurde, fand zu den postoperativen Überlebenszeiten (ÜLZ) von drei und zehn Tagen, zwei, drei, vier, acht und zwölf Wochen sowie nach sechs und zwölf Monaten statt. Für die retrograde Markierung wurde das biotinylierte Dextranamin (BDA) eingesetzt, das unter Verwendung des Chromogens Diaminobenzidin visualisiert wurde.

Die folgenden Befunde konnten auf lichtmikroskopischer Ebene ermittelt werden:

- axonale Schwellungen,
- dornenförmige Fortsätze,
- intraretinale Axonsprosse mit Wachstumskegeln,
- zwei Formen von intraretinalen Axonkollateralen und
- aberrante axonale Trajektorien in Form von Schleifenaxonen.

Basierend auf dem lichtmikroskopischen Befund wurden ausgewählte Bereiche der Netzhaut ultrastrukturell untersucht.

Axonale Schwellungen konnten hinsichtlich ihrer Gestalt in spindelförmig, ballonierend und breitbasig polypös unterschieden werden. Dornenförmige Fortsätze an den Nervenfasern stellen vermutlich ein morphologisches Erscheinungsbild zur Herstellung eines funktionellen Gleichgewichts dar. Die intraretinalen Axonsprosse mit ihren birnenförmigen Wachstumskegeln konnten erstmalig elektronenmikroskopisch in einer adulten Rattennetzhaut nach einer Schädigung

des *Nervus opticus* beschrieben werden. Die nach den ÜLZ von zehn Tagen, zwei, drei und vier Wochen dokumentierten aberranten Fortsätze orientierten sich hauptsächlich vom *Discus nervi optici* zur Netzhautperipherie. Zu allen ÜLZ besaßen sie eine rundliche oder ovoide Gestalt und wiesen eine Größe von 5 bis 10 µm auf. Sie gingen aus einem Hauptfaszikel in der Nervenfaserschicht hervor und existierten in enger Korrelation zu benachbarten Axonen und Blutgefäßen. Die Definition des Wachstumskegels wurde durch den ultrastrukturellen Befund der Akkumulation von Mitochondrien und wachstumskegeltypischen Vesikeln verifiziert. Die Axonsprosse mit ihren Wachstumskegeln stellen das morphologische Substrat von temporären Reorganisationen der RGC nach einer Unterbrechung ihrer axonalen Efferenz dar.

Es waren zwei Formen von intraretinalen Axonkollateralen sichtbar. Bei der ersten Form handelt es sich um eine axonale Kollateralisierung nach einem dreiwöchigen Versuch, die unmittelbar hinter dem Axonhügel einer Typ-III-RGC abzweigte. Diese Form der Kollateralisierung könnte vermutlich im Zusammenhang mit regenerativen Leistungen in der Netzhaut stehen, die unter dem Begriff *axon-like processes* definiert wurden. Die zweite Kollateralisierungsform zwei Wochen nach der Läsion bildete sich in einem orthogonalen Winkel von einer Nervenfaser in einem Axonfaszikel und entsendete mehrere Kollateralzweige. Acht Wochen nach einer *Nervus opticus*-Axotomie konnte eine Axonkollaterale dokumentiert werden, die sich in einem fortgeschrittenen Degenerationsprozess befand. Die beschriebene intraretinale Axonkollaterale konnte erstmalig bei der adulten Albinoratte beschrieben werden.

Zwei und drei Wochen *post lesionem* konnten in zwei Versuchen Nervenfasern dokumentiert werden, die durch eine auffallende Schleifenbildung gekennzeichnet waren.

Resümierend konnte auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene nachgewiesen werden, dass geschädigte retinale Ganglienzellen in der adulten Ratte zu axonalem Wachstum ohne neuroprotektive und neuropermissive Unterstützung fähig sind. Die beobachteten regenerativen Leistungen sind vermutlich auf das Wirken von Neurotrophen in der Retina oder im Sehnerv selbst zurückzuführen.

7 Summary

Hoffmann, Anke

Qualitative analysis of the nerve fiber layer in the retina of the adult albino rat following transection of the optic nerve: Ultrastructural evidence of intraretinal growth cones

University of Leipzig, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Anatomy
128 pp., 42 Fig., 1 Tab., 342 Ref.

The present light and electron microscopic study was undertaken to determine whether axotomized retinal ganglion cells are able to reestablish intraretinal axons without experimental neuroprotective support. 37 adult albino rats (WISTAR-Prob) were used. In a first step, the optic nerve was intraorbitally exposed and crushed for 30 s at about 5 mm from the ocular bulb. A second experiment was conducted in order to stain newly formed intraretinal axonal elements after postlesion times of either three and ten days, two, three, four, eight, and twelve weeks, or six and twelve month. Retrograde labelling was achieved using biotinylated dextran amine (BDA), followed by visualization with diaminobenzidine as chromogen. The following structures were detected light microscopically:

- axonal swellings,
- spine-like processes,
- intraretinal axonal sprouts showing growth cones,
- two types of axonal collaterals, and
- aberrant axonal fibers forming so-called looping axons.

On the basis of light microscopy selected areas of the retina were examined electron microscopically. Axonal swellings were typified by their shape as spindle-shaped, ballon-shaped or broad-based polypous. Also spine-like processes, which might serve the reestablishment of a functional balance within the retinal network, were detected. Intraretinal axonal sprouts, showing pear-shaped growth cones at their endings, could be demonstrated for the first time on the ultrastructural level. Aberrant processes, most of them orientated from the optic disc to the retinal periphery, were found at survival times of ten days as well as after two, three and four weeks. At all survival stages investigated the growth cones showed a plump or ovoid morphology and ranged in size between 5 to 10 μm . Usually, they were found to originate from nerve fiber fascicles located in close neighbourhood to the axons but also to blood vessels of the inner retina. The light microscopical typification of growth cones was confirmed at the ultrastructural level, particularly as

Summary

accumulated mitochondria and growth cone-specific vesicles were detected. Probably, axonal sprouts and growth cones represent a temporal attempt of retinal ganglion cells to regenerate after transection of the optic nerve. Two axon collaterals were detected in the inner retina. In the first case, three weeks postlesion, an axon was found to branch immediately behind the axon hillhock of a type III ganglion cell. This kind of collateralization is indicative of a regenerative response as it has been previously reported by other authors who found so-called *axon-like processes*. In a second case, two weeks postlesion, an axon appeared to bifurcate orthogonally from a fiber fascicle sending off several collaterals on its way. Furthermore, a degenerating axon collateral was seen eight weeks after optic nerve lesion. The types of axon collaterals presented in this study were described for the first time in the albino rat. So-called looping axons typically characterized by their circular course were found in the inner retina two and three weeks postlesion. In conclusion, the light and electron microscopical results demonstrate that axotomized retinal ganglion cells of the adult rat retain the capability for axonal outgrowth without any neuroprotective and neuropermissive support. Since no experimental growth-promoting measures had been taken, it might be speculated whether the observed regenerative processes were due to intrinsic neurotrophic factors in the retina or the optic nerve themselves.

8 Literaturverzeichnis

ADAMS, J. C. (1977):

Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker.
Neuroscience 2, 141 - 145.

ADAMS, J. H., D. I. GRAHAM, L. S. MURRAY u. G. SCOTT (1982):

Diffuse axonal injury due to nonmissile head injury in humans: an analysis of 45 cases.
Ann. Neurol. 12, 557 - 563.

ADLER, R., u. D. FARBER (1986):

The retina: A model for cell biology studies.
Academic Press, Orlando, Part I, S. 5

AGUAYO, A. J. (1985):

Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system.
In: COTMAN, W. (eds.): Synaptic Plasticity.
Guilford Press, New York, S. 457 - 484

AGUAYO, A. J., Å. BJÖRKLUND, U. STENEVI u. T. CARLSTEDT (1984):

Fetal mesencephalic neurons survive and extend long axons across peripheral nervous system grafts inserted into the adult striatum.
Neurosci. Lett. 45, 53 - 57.

AGUAYO, A. J., M. BENFEY u. S. DAVID (1983):

A potential for axon regeneration in neurons of the adult mammalian nervous system.
Birth Defects 19, 327 - 340.

AGUAYO, A. J., M. RASMINSKY, G. M. BRAY, S. CARBONETTO,

L. McKERRACHER, M. P. VILLEGAS-PEREZ, M. VIDAL-SANZ u. D. A. CARTER (1991):
Degenerative and regenerative response of injured neurons in the central nervous system of adult mammals.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 331, 337 - 343.

AGUAYO, A. J., S. DAVID u. G. M. BRAY (1981):

Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents.
J. Exp. Biol. 95, 231 - 240.

AL-ALI, S. Y., A. G. H. AL-ZUHAIR u. B. DAWOD (1988):

Ultrastructural study of phagocytic activities of young astrocytes in injured neonatal rat brain following intracerebral injection of colloidal carbon.
Glia 1, 211 - 218.

ALLCUTT, D., M. BERRY u. J. SIEVERS (1984a):

A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cells to optic nerve crush in neonatal and adult mice.

Dev. Brain Res. 16, 219 - 230.

ALLCUTT, D., M. BERRY u. J. SIEVERS (1984b):

A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cell axons to optic nerve crush in neonatal and adult mice.

Dev. Brain Res. 16, 231 - 240.

ANDERSON, H. J., A. J. AGUAYO, S. E. BLACKSHAW, D. BRAY, R. W. GILLIAT, A. D. GRINELL, G. W. KREUTZBERG, I. PARNAS, D. PURVES, S. ROTSHENKER, M. E. SCHWAB u. M. B. WILLARD (1982):

Early responses to neural injury - Group report.

In: NICHOLLS, J. G. (eds.): Repair and Regeneration of the Nervous System.

Dahlem Konferenzen 1982, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 315 - 339.

ARD, M. D., R. P. BUNGE u. M. P. BUNGE (1987):

A comparison of the Schwann cell surface and Schwann cell extracellular matrix as promoters of neurite growth.

J. Neurocytol. 16, 539 - 555.

ASHERY, U., R. PENNER u. M. E. SPIRA (1996):

Acceleration of membrane recycling by axotomy of cultured Aplysia neurons.

Neuron 16, 641 - 651.

ASSOULINE, J. G., P. BOSCH, R. LIM, I. S. KIM, R. JENSEN u. N. P. PANTAZIS (1987):

Rat astrocytes and Schwann cells in culture synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors.

Dev. Brain Res. 31, 103 - 118.

AZZARELLI, B., R. WOODBORN, S. OLIVELLE, S. KIMBRO, A. SIAKOTOS, M. TAYLOR, C.-H. LEE, M. YEN u. J. PAULSRUD (1993):

The A-1 antigen: a novel marker in experimental peripheral nerve injury.

J. Comp. Neurol. 337, 353 - 365.

BAAS, P. W., u. S. R. HEIDEMANN (1986):

Microtubule reassembly from nucleating fragments during the regrowth of amputated neurites.

J. Cell Biol. 103, 917 - 927.

BAEHR, M., u. R. P. BUNGE (1989):

Functional status influences the ability of Schwann cells to support adult rat retinal ganglion cell survival and axonal regrowth.

Exp. Neurol. 106, 27 - 40.

BAEHR, M., A. WIZENMANN u. S. THANOS (1992):

Effect of bilateral tectum lesions on retinal ganglion cell morphology in rats.

J. Comp. Neurol. 320, 370 - 380.

- BAEHR, M., C. PRZYREMBEL u. M. BASTMEYER (1995):
Astrocytes from adult rat optic nerves are nonpermissive for regenerating retinal ganglion cell axons.
Exp. Neurol. 131, 211 - 220.
- BAICHWAL, R. R., J. W. BIGBEE u. G. H. DEVRIES (1988):
Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultered Schwann cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 1701 - 1705.
- BAIER, H., u. F. BONHOEFFER (1994):
Attractive axon guidance molecules.
Science 265, 1541 - 1542.
- BAKER, G. E., u. G. JEFFERY (1989):
Distribution of uncrossed axons along the course of the optic nerve and chiasm of rodents.
J. Comp. Neurol. 289, 455 - 461.
- BALENTINE, J. D., u. W. B. GREENE (1984):
Ultrastructural pathology of nerve fibers in calcium-induced myelopathy.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 43, 500 - 510.
- BARBER, P. C. (1981):
Axonal growth by newly-formed vomeronasal neurosensory cells in the normal adult mouse.
Brain Res. 216, 229 - 237.
- BARRETT, C. P., E. J. DONATI u. L. GUTH (1984):
Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury.
Exp. Neurol. 84, 374 - 385.
- BARRON, K. D. (1989):
Neuronal responses to axotomy. Consequences and possibilities for rescue from permanent atrophy or cell death.
In: SEIL, F. J., u. R. ALAN (eds.): Neural Regeneration and Transplantation.
Liss., S. 79 - 99
- BARRON, K. D., M. P. DENTINGER, G. KROHEL, S. K. EASTEN u. R. MANKES (1986):
Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital nerve crush.
J. Neurocytol. 15, 345 - 362.
- BARRON, K. D., T. Y. CHIANG, A. C. DANIELS u. P. F. DOOLIN (1971):
In: ZIMMERMANN, H. M. (eds.): Progress in Neuropathology 1.
Grune & Stratton, New York
- BASTMEYER, M., M. BECKMANN, M. E. SCHWAB u. C. A. O. STUERMER (1991):
Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocytelike cells and fish CNS myelin.
J. Neurosci. 11, 626 - 640.

Literaturverzeichnis

BATES, C. A., u. R. L. MEYER (1997):

The neurite-promoting effect of laminin is mediated by different mechanism in embryonic and adult regenerating mouse optic axons *in vitro*.

Dev. Biol. 181, 91 - 101.

BERG, R. (1985):

Lehre von den Sinnesorganen.

In: KOCH, T., u. R. BERG (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-Anatomie.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, Bd. 3, 4. Aufl., S. 490

BERNSTEIN, D. R., D. E. BECHARD u. D. J. STELZNER (1981):

Neuritic growth maintained near the lesion site long after spinal cord transection in the newborn rat.

Neurosci. Lett. 26, 55 - 60.

BERRY, M. (1979):

Regeneration in the central nervous system.

In: SMITH, W. T. (eds.): Recent advances in neuropathology. Vol. 1.

Churchill Livingstone, Edinburgh, S. 67 - 111

BERRY, M. (1982):

Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: an hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian central nervous system.

In: BERRY, M. (eds.): Growth and regeneration of axons in the nervous system.

Bibl. Anat. 23, 1 - 11.

BERRY, M., L. REES u. J. SIEVERS (1986):

Unequivocal regeneration of rat optic nerve axons into sciatic nerve isografts.

In: DAS, G. D., u. R. B. WALLACE (eds.): Neural Transplantation and Regeneration.

Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, S. 65 - 79

BERRY, M., L. REES, S. HALL, P. YIU u. J. SIEVERS (1988):

Optic axons regenerate into sciatic nerve isografts only in the presence of Schwann cells.

Brain Res. Bull. 20, 223 - 231.

BERRY, M., u. A. C. RICHES (1974):

An immunological approach to regeneration in the central nervous system.

Br. Med. Bull. 30, 135 - 140.

BEUCHE, W., u. R. L. FRIEDE (1984):

The role of non-resident cells in Wallerian degeneration.

J. Neurocytol. 13, 767 - 796.

BISBY, M. A., u. V. T. BULGER (1977):

Reversal of axonal transport at a nerve crush.

J. Neurochem. 29, 313 - 320.

BLINZINGER, K., u. G. KREUTZBERG (1968):

Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglia cells.

Z. Zellforsch. 85, 145 - 157.

BOENISCH, T. (1989):

Färbemethoden.

In: NAISH, S. J. (eds.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden.

Copyright DAKO cooperation, S. 22 - 27

BOSSY, J. (1970):

Atlas of neuroanatomy and special sense organs.

Saunders, Philadelphia, S. 617

BOYCOTT, B. B., u. H. WÄSSLE (1974):

The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina.

J. Physiol. (Lond.), 240, 397 - 419.

BOYCOTT, B. B., u. J. E. DOWLING (1969):

Organization of the primate retinae: light microscopy.

Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 255, 109 - 194.

BOYLES, J. K., L. M. NOTTERPEK u. L. J. ANDERSON (1990):

Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve.

J. Biol. Chem. 265, 17805 - 17815.

BRAAK, H., u. E. BRAAK (1985):

Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex.

Prog. Neurobiol. 25, 93 - 139.

BRAY, G. M., M. VIDAL-SANZ, M. P. VILLEGAS-PEREZ, D. A. CARTER, T. ZWIMPFER u. A. J. AGUAYO (1992):

Growth and differentiation of regenerating CNS axons in adult mammals.

In: LETOURNEAU, P. C., S. B. KATER u. E. R. MACAGNO (eds.): The Nerve Growth Cone.

Raven Press, New York, S. 489 - 504

BREGMAN, B. S., E. KUNKEL-BAGDEN, L. SCHNELL, H. N. DAL, D. GAO u. M. E. SCHWAB (1995):

Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors.

Nature 378, 498 - 501.

BRIDGMAN, P. C. (1992):

Functional anatomy of the growth cone in relation to its role in locomotion and neurite assembly.

In: LETOURNEAU, P. C., S. B. KATER u. E. R. MACAGNO (eds.): The Nerve Growth Cone.

Raven Press, New York, S. 39 - 53

BRIDGMAN, P. C., u. M. E. DAILEY (1989):

The organization of myosin and actin in rapid frozen nerve growth cones.

J. Cell Biol. 108, 95 - 109.

Literaturverzeichnis

BRITTIS, P. A., u. J. SILVER (1995):

Multiple factors govern intraretinal axon guidance: a time-lapse study.
Mol. Cell Neurosci. 6, 413 - 432.

BRODAL, A. (1940):

Modification of the „Gudden method“ for study of cerebral localization.
Arch. Neurol. Psychiat. 43, 46 - 58.

BROWN, J. E. (1965):

Dendritic field of retinal ganglion cells of the rat.
J. Neurophysiol. 28, 1091 - 1100.

BULGER, V. T., u. M. A. BISBY (1978):

Reversal of axonal transport in regenerating nerves.
J. Neurochem. 31, 1411 - 1418.

BUNGE, M. B. (1973):

Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture.
J. Cell Biol. 56, 713 - 735.

BUNT, A. H. (1976):

Ramification patterns of ganglion cell dendrites in the retina of the albino rat.
Brain Res. 103, 1 - 8.

CAMINOS, E., E. BECKER, D. MARTIN-ZANCA u. E. VECINO (1999):

Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration.
J. Comp. Neurol. 404, 321 - 331.

CAMPBELL, G., J. K. HOLT, H. R. SHOTTON, P. N. ANDERSON, S. BAVETTA u. A. R. LIEBERMAN (1999):

Spontaneous axonal regeneration after optic nerve injury in adult rat.
Neuroreport. 10, 3955 - 3960.

CARBONETTO, S., D. EVANS u. P. COCHARD (1987):

Nerve fiber growth in culture on tissue substrata from central and peripheral nervous system.
J. Neurosci. 7, 610 - 620.

CARMIGNOTO, G. L., L. MAFFEI, P. CANDEO, R. CANELLA u. M. C. COMELLI (1989):

Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section.
J. Neurosci. 9, 1263 - 1272.

CARTER, D. A., G. M. BRAY u. A. J. AGUAYO (1989):

Regenerated retinal ganglion cell axons conform well-differentiated synapses in the superior colliculus of adult hamsters.
J. Neurosci. 9, 4042 - 4050.

CAVANAGH, J. B. (1970):

The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain.
J. Anat. 106, 471 - 487.

CHAMBERS, W. W. (1955):

Structural regeneration in the mammalian central nervous system in relation to age.

In: WINDLE, W. F. (eds.): Regeneration in the central nervous system.

Thomas, Springfield, S. 135 - 146

CHEN, M., A. R. HARVEY u. S. E. DYSON (1991):

Regrowth of lesioned retinal axons associated with the transplantation of Schwann cells to the brachial region of the rat optic tract.

Restor. Neurol. Neurosci. 2, 233 - 248.

CHO, E. Y. P., u. K.-F. SO (1989):

De novo formation of axon-like processes from axotomized retinal ganglion cells which exhibit long distance growth in a peripheral nerve graft in adult hamsters.

Brain Res. 484, 371 - 377.

CHO, E. Y. P., u. K.-F. SO (1992):

Characterization of sprouting response of axon-like processes from retinal ganglion cells after axotomy in adult hamsters: a model using intravitreal implantation of peripheral nerve.

J. Neurocytol. 21, 589 - 603.

CHRISTMAN, C. W., J. B. SALVANT JR., S. A. WALKER u. J. T. POVLISHOCK (1997):

Characterization of a prolonged regenerative attempt by diffusely injured axons following traumatic brain injury in adult cat: a light and electron microscopic immunocytochemical study.

Acta Neuropathol. 94, 329 - 337.

CLEMENTE, C. D. (1964):

Regeneration in the vertebrate central nervous system.

Int. Rev. Neurobiol. 6, 257 - 301.

COHRS, -, - JAFFE u. - MIESEU (1958):

Augen: III. Ratte.

In: Pathologie der Laboratoriumstiere I.

Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, S. 625 - 632

COOK, J. E. (1982):

Errant axons in the normal goldfish retina reach retinotopic tectal sites.

Brain Res. 250, 154 - 158.

COOK, R. D., u. H. M. WISNIEWSKI (1973):

The role of oligodendroglia and astroglia in Wallerian degeneration of the optic nerve.

Brain Res. 61, 191 - 206.

COWAN, W. M. (1973):

Neuronal death as a regulative mechanism in the control of cell number in the nervous system.

In: ROCKSTEIN, M. (eds.): Development and Aging in the Nervous System.

Academic Press, New York, S. 19 - 41.

Literaturverzeichnis

COWAN, W. M., u. T. P. S. POWELL (1963):
Centrifugal fibers in the avian visual system.
Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 158, 232 - 252.

CRAGG, B. G. (1970):
What is the signal for chromatolysis?
Brain Res. 23, 1 - 21.

CRAGG, B. G., u. P. K. THOMAS (1964):
The conduction velocity of regenerating peripheral nerve fibers.
J. Physiol., Lond. 171, 164 - 175.

CRESPO, D., D. D. M. O'LEARY u. W. M. COWAN (1985):
Changes in the number of optic nerve fibers during late prenatal and postnatal development in the albino rat.
Dev. Brain Res. 19, 129 - 134.

CRUTCHER, K. A. (1987):
Sympathetic sprouting in the central nervous system: a model for studies of axonal growth in the mature mammalian brain.
Brain Res. Rev. 12, 203 - 233.

CRUTCHER, K. A., L. BROTHERS u. J. N. DAVIS (1981):
Sympathetic noradrenergic sprouting in response to central cholinergic denervation: a histochemical study of neuronal sprouting in the rat hippocampal formation.
Brain Res. 210, 115 - 128.

CYPHER, C., u. P. C. LETOURNEAU (1991):
Identification of cytoskeletal, focal adhesion, and cell adhesion proteins in growth cone particles isolated from developing chick brain.
J. Neurosci. Res. 30, 259 - 265.

DACEY, D. M. (1985):
Wide-spreading terminal axons in the inner plexiform layer of the cat's retina: Evidence for intrinsic axon collaterals of ganglion cells.
J. Comp. Neurol. 242, 247 - 262.

DAHME, E. (1989):
Nervensystem.
In: SANDERSLEBEN, J. von, K. DÄMMRICH u. E. DAHME (Hrsg.): Pathologische Histologie der Haustiere.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 3. Aufl., S. 276

DAVID, S., u. A. J. AGUAYO (1981):
Axonal elongation into peripheral nervous system „bridges“ after central nervous system injury in adult rats.
Science 214, 931 - 933.

DAVID, S., u. A. J. AGUAYO (1985):

Axonal regeneration after crush injury of rat central nervous system fibers innervating peripheral nerve grafts.

J. Neurocytol. 14, 1 - 12.

DAVIES, S. J. A., P. M. FIELD u. G. RAISMAN (1996):

Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways.

Exp. Neurol. 142, 203 - 216.

DAVIS, L., P. DOU, M. DEWIT u. S. B. KATER (1992):

Protein synthesis within neuronal growth cones.

J. Neurosci. 12, 4867 - 4877.

DEZAWA, M., u. E. ADACHI-USAMI (2000):

Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration.

Prog. Retin. Eye Res. 19, 171 - 204.

DIAMOND, J., u. P. C. JACKSON (1980):

Regeneration and collateral sprouting of peripheral nerves.

In: JEWETT, D. L., u. H. R. MCCARROLL (eds.): Nerve Repair and Regeneration.

Sant Louis, S. 115-127

DREHER, B., A. J. SEFTON, S. Y. K. NI u. G. NISBETT (1985):

The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats.

Brain Behav. Evol. 26, 10 - 48.

DREHER, B., R. A. POTTS u. M. R. BENNETT (1983):

Evidence that the early postnatal reduction in the number of rat retinal ganglion cells is due to a wave of ganglion cell death.

Neurosci. Lett. 36, 255 - 259.

DUBOIS-DALCQ, M., B. RENTIER, A. BARON-VAN EVERCOOREN u. B. BURGE (1981):

Structure and behavior of rat primary and secondary Schwann cells *in vitro*.

Exp. Cell Res. 131, 1071 - 1080.

DUFFY, M. T., S. B. SIMPSON, D. R. LIEBLICH u. B. M. DAVIS (1990):

Origin of spinal cord axons in the lizard regenerated tail: supernormal projections from spinal neurons.

J. Comp. Neurol. 293, 208 - 222.

EARYS, J. T. (1952):

Relationship between the ganglion cell layer of the retina and the optic nerve in the rat.

Br. J. Ophthalmol. 36, 453 - 459.

EASTER, S. S., JR., A. C. RUSOFF u. P. E. KISH (1981):

The growth and organization of the optic nerve and tract in juvenile and adult goldfish.

J. Neurosci. 1, 793 - 811.

Literaturverzeichnis

ENGELE, J., u. M. C. BOHN (1991):

The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons *in vitro* are mediated by mesencephalic glia.

J. Neurosci. 11, 3070 - 3078.

EVERCOOREN, A. B., H. K. KLEINMAN, H. E. J. SEPPA, B. RENTIER u. M. DUBOIS-DALCQ (1982):

Fibronectin promotes Schwann cell growth and motility.

J. Cell Biol. 93, 216 - 221.

EYSEL, U. T., F. GONZALEZ-AGUILAR u. U. MAYER (1981):

Time-dependent decrease in the extent of visual deafferentation in the lateral geniculate nucleus of adult cats with small retinal lesions.

Exp. Brain Res. 41, 256 - 263.

EYSEL, U. T., O.-J. GRÜSSER u. J. P. SAAVEDRA (1974):

Signal transmission through degenerating synapses in the lateral geniculate body of the cat.

Brain Res. 76, 49.

EYSEL, U. T., u. L. PEICHL (1985):

Regenerative capacity of retinal axons in the cat, rabbit, and guinea pig.

Exp. Neurol. 88, 757 - 766.

FERGUSON, I. A., J. B. SCHWEITZER u. E. M. JOHNSON (1990):

Basic fibroblast growth factor: receptor-mediated internalization, metabolism, and anterograde axonal transport in retinal ganglion cells.

J. Neurosci. 10, 2176 - 2189.

FERINGA, E. R., G. G. GURDEN, W. STRODEL, W. CHANDLER u. J. KNAKE (1973):

Descending spinal motor tract regeneration after spinal cord transection.

Neurology 23, 599 - 608.

FORD-HOLEVINSKI, T. S., J. M. HOPKINS, J. P. McCOY u. B. W. AGRANOFF (1986):

Laminin supports neurite outgrowth from explants of axotomized adult rat retinal neurons.

Dev. Brain Res. 28, 121 - 126.

FORMAN, D. S. (1983):

Axonal transport and nerve regeneration: A Review.

In: KAO, C. C., R. P. BUNGE u. P. J. REIER (eds.): Spinal Cord Reconstruction.

Raven Press, New York, S. 75 - 86

FORRESTER, J., u. A. PETERS (1967):

Nerve fibres in optic nerve of rat.

Nature 214, 245 - 247.

FOURNIER, A. E., J. BEER, C. O. ARREGUI, C. ESSAGIAN, A. J. AGUAYO u. L. McKER-
RACHER (1997):

Brain-derived neurotrophic factor modulates GAP-43 but not τ 1 expression in injured retinal gan-
glion cells of adult rats.

J. Neurosci. Res. 47, 561 - 572.

FUKUDA, Y. (1971):

Receptive field organization of cat optic nerve fibers with special reference to conduction velocity.

Vision Res. 11, 209 - 226.

FUKUDA, Y. (1977):

A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies.

Brain Res. 119, 327 - 344.

FUTERMAN, A. H., u. G. A. BANKER (1996):

The economics of neurite outgrowth: the addition of new membrane to growing axon.

Trends Neurosci. 19, 144 - 149.

GALLEGO, A., u. J. CRUZ (1965):

Mammalian retina: Association nerve cells in ganglion cell layer.

Science 50, 1313 - 1314.

GEHRMANN, J. (1996):

Microglia: a sensor to threats in the nervous system?

Res. Virol. 147, 79 - 88.

GELLRICH, N. C., U. T. EYSEL u. E. MACHTENS (1996):

Sehnervschädigung: ein Tiermodell.

Fortschr. Kiefer- Gesichtschir. 41, 1 - 6.

GIERER, A. (1987):

Directional cues for growing axons forming the retinotectal projection.

Development 101, 479 - 489.

GIULIAN, D., J. CHEN, J. E. INGEMAN, K. G. JOHNSON u. M. NOPONEN (1989):

The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian
brain.

J. Neurosci. 9, 4416 - 4429.

GODEMENT, P., J. VANSELOW, S. THANOS u. F. BONHOEFFER (1987):

A study in developing visual systems with a new method of staining neurons and their processes in
fixed tissue.

Development 101, 697 - 713.

GODEMENT, P., L. C. WANG u. C. A. MASON (1994):

Retinal axon divergence at the optic chiasm: Dynamics of growth cone behavior at the midline.

J. Neurosci. 14, 7024 - 7039.

Literaturverzeichnis

GOLDBERG, D. J., D. W. BURMEISTER u. R. J. RIVAS (1992):

Video microscopic analysis of events in the growth cone underlying axon growth and the regulation of these events by substrate-bound proteins.

In: LETOURNEAU, P. C., S. B. KATER u. E. R. MACAGNO (eds.): The Nerve Growth Cone. Raven Press, New York, S. 79 - 96

GOLDBERG, S., u. B. FRANK (1980):

Will central nervous system in the adult mammal regenerate after bypassing a lesion? A study in the mouse and chick visual systems.

Exp. Neurol. 70, 675 - 689.

GOODMAN, C. S. (1994):

The likeness of being: Phylogenetically conserved molecular mechanism of growth cone guidance. Cell 78, 353 - 356.

GRAEBER, M. B., u. G. W. KREUTZBERG (1988):

Delayed astrocyte reaction following facial nerve axotomy.

J. Neurocytol. 17, 209 - 220.

GRAFSTEIN, B. u. I. G. McQUARRIE (1978):

The role of the nerve cell body in axonal regeneration.

In: COTMAN, C. W. (eds.): Neuronal Plasticity.

Raven Press, New York, S. 155 - 195

GRAFSTEIN, B., u. N. A. INGOGLIA (1982):

Intracranial transection of the optic nerve in adult mice; preliminary observations.

Exp. Neurol. 76, 318 - 330.

GRAHAM, D. I., R. RAGHUPATHI, K. E. SAATMAN, D. MEANEY u. T. K. McINTOSH (2000):

Tissue tears in the white matter after lateral fluid percussion brain injury in the rat: relevance to human brain injury.

Acta Neuropathol. 99, 117 - 124.

GRIFFIN, J. W., D. L. PRICE, D. B. DRACHMAN u. J. MORRIS (1981):

Incorporation of axonally transported glycoproteins into axolemma during nerve regeneration.

J. Cell Biol. 88, 205 - 214.

GRIFFITHS, I. R., M. C. McCULLOCH u. S. ABRAHAM (1985):

Progressive axonopathy: an inherited neuropathy of boxer dogs. 2. The nature and distribution of the pathological changes.

Neuropathol. Appl. Neurobiol. 11, 431 - 446.

GÜRTLER, J. (1997):

Intrazelluläre Füllung von retrograd markierten retinalen Ganglienzellen nach Axotomie des Sehnerven der Ratte.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

GUTH, L. (1956):

Regeneration in the mammalian peripheral nervous system.
Physiol. Rev. 26, 441 - 478.

GUTH, L., C. P. BARRETT, E. J. DONATI, S. S. DESHPANDE u. E. X. ALBUQUERQUE (1981):

Histopathological reactions and axonal regeneration in the transected spinal cord of hibernating squirrels.
J. Comp. Neurol. 203, 297 - 308.

GUTH, L., P. J. REIER, C. P. BARRETT u. E. J. DONATI (1983):

Repair of the mammalian spinal cord.
Trends Neurosci. 6, 20 - 24.

HAGEMAN, G. S., M. A. KIRCHOFF-REMPE, G. P. LEWIS, S. K. FISHER u. D. H. ANDERSON (1991):

Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 6706 - 6710.

HALL, S. M. (1989):

Regeneration in the peripheral nervous system.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 15, 513 - 529.

HALL, S. M., M. BERRY u. J. P. WYSE (1992):

Regrowth of PNS axons through grafts of the optic nerve of the Browman-Wyse (BW) mutant rat.
J. Neurocytol. 21, 402 - 412.

HALL, S. M., u. M. BERRY (1989):

Electron microscopic study of the interaction of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts.
J. Neurocytol. 18, 171 - 184.

HARRIS, W. A., C. E. HOLT u. F. BONHOEFFER (1987):

Retinal axons with and without their somata, growing to and arborizing in the tectum of *Xenopus* embryos: a time-lapse video study of single fibers *in vivo*.
Development 101, 123 - 133.

HARVEY, M. H., u. G. W. PLANT (1995):

Schwann cells and fetal tectal tissue cografted to the midbrain of newborn rats: fate of Schwann cells and their influence on host retinal innervation of grafts.
Exp. Neurol. 134, 179 - 191.

HEINICKE, E. A., u. J. A. KIERNAN (1978):

Vascular permeability and axonal regeneration in skin autotransplanted into the brain.
J. Anat. 125, 409 - 420.

Literaturverzeichnis

HERDEGEN, T., M. BASTMEYER, M. BAEHR, C. A. O. STUERMER, R. BRAVO u. M. ZIMMERMANN (1993):

Expression of JUN, KROX and CREB transcription factors in goldfish and rat retinal ganglion cells following optic nerve lesions is related to axonal sprouting.
J. Neurobiol. 24, 528 - 543.

HOFFMANN, J. R., u. K. S. O'SHEA (1999):

Thrombospondin expression in nerve regeneration II. Comparison of optic nerve crush in the mouse and goldfish.
Brain Res. Bull. 48, 421 - 427.

HOLDER, N., u. J. D. W. CLARKE (1988):

Is there a correlation between continuous neurogenesis and directed axon regeneration in the vertebrate nervous system?
Trends Neurosci. 11, 94 - 99.

HOLLÄNDER, H., S. BISTI u. L. MAFFEI (1985):

Long term survival of cat retinal ganglion cells after intracranial optic nerve transection.
Exp. Brain Res. 59, 633 - 635.

HONIG, M. G., u. R. I. HUME (1986):

Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures.
J. Cell Biol. 103, 171 - 187.

HOOKE, D. (1932):

Spinal cord regeneration in the young rainbow fish, *Lebistas reticulatus*.
J. Comp. Neurol. 56, 277 - 297.

HORSBURGH, G. M., u. A. J. SEFTON (1987):

Cellular degeneration and synaptogenesis in the developing retina of the rat.
J. Comp. Neurol. 263, 553 - 566.

HUGHES, A. (1975):

A quantitative analysis of the cat retinal ganglion cell topography and its projection into the visual field.
J. Comp. Neurol. 163, 107 - 128.

HUGHES, A. (1977):

The pigmented-rat optic nerve: Fibre count and fibre diameter spectrum.
J. Comp. Neurol. 176, 263 - 268.

IDE, C., K. TOHYAMA, R. TOKOTA, T. NITATORI u. S. ONODERA (1983):

Schwann cell basal lamina and nerve regeneration.
Brain Res. 288, 61 - 75.

IGNATIUS, M. J., E. M. SHOOTER, R. E. PITAS u. R. W. MAHLEY (1987):

Lipoprotein uptake by neuronal growth cones *in vivo*.
Science 236, 959 - 962.

ITAYA, S. K., u. P. W. ITAYA (1985):

Centrifugal fibers to the rat retina from the medial pretectal area and the periaqueductal grey matter. Brain Res. 326, 362 - 365.

JEFFERY, G. (1984):

Retinal ganglion cell death and terminal field retraction in the developing rodent visual system. Brain Res. 315, 81 - 96.

JESSELL, T. M. (1996):

In: KANDEL, E. R., J. H. SCHWARTZ u. T. M. JESSELL (Hrsg.): Neurowissenschaften, Eine Einführung.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 106

JOHNS, P. A. (1977):

Growth of the adult goldfish eye. III. Source of new retinal cells. J. Comp. Neurol. 176, 343 - 357.

JOHNSON, J. E., Y. A. BARDE, M. SCHWAB u. H. THOENEN (1986):

Brain derived neurotrophic factors support the survival of cultured retinal ganglion cells. J. Neurosci. 6, 3031 - 3038.

KALIL, K., u. T. REH (1982):

A light and electron microscopic study of regrowing pyramidal tract fibers. J. Comp. Neurol. 211, 265 - 275.

KAO, C. C., L. W. CHANGE u. J. M. B. BLOODWORTH (1977):

The mechanism of spinal cord cavitation following spinal cord transection. II. Electron microscopic observations.

J. Neurosurg. 46, 745 - 756.

KARLSON, P. (1988):

Nucleinsäure-Synthese und Expression der genetischen Information.

In: KARLSON, P. (Hrsg.): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 13. Aufl., S. 121

KEIRSTEAD, S. A., M. VIDAL-SANZ, M. RASMINSKI, A. J. AGUAYO, M. LEVESQUE u. K.-F. SO (1985):

Responses to light of retinal neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts in the rat. Brain Res. 359, 402 - 406.

KETTENMANN, H., u. R. B. RANSOM (1995):

Neuroglia.

Oxford University Press, New York, Oxford

KEYNES, R. J., W. G. HOPKINS u. L. H. HUANG (1984):

Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fiber basement membrane.

Brain Res. 295, 275 - 281.

Literaturverzeichnis

KIERNAN, J. A. (1978):

An explanation of axonal regeneration in peripheral nerves and its failure in the central nervous system.

Med. Hypotheses 4, 15 - 26.

KIERNAN, J. A. (1985):

Axonal and vascular changes following injury to the rat's optic nerve.

J. Anat. 141, 139 - 154.

KIERNAN, J. A., u. A. CONTESTABILE (1980):

Vascular permeability associated with axonal regeneration in the optic system of the goldfish.

Acta Neuropathol. 51, 39 - 45.

KIRSCHE, W. (1951):

Die regenerativen Vorgänge am Rückenmark erwachsenen teleostier nach operativer Kontinuitätstrennung.

Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 56, 190 - 265.

KLEITMAN, N., u. M. I. JOHNSON (1989):

Rapid growth cone translocation on laminin is supported by lamellipodial not filopodial structures.

Cell Motil. Cytoskel. 13, 288 - 300.

KOBAYASHI, N. R., D.-P. FAN, K. M. GIEHL, A. M. BEDARD, S. J. WIEGAND u. W.

TETZLAFF (1997):

BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and α 1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration.

J. Neurosci. 17, 9583 - 9595.

KOLB, E. (1989):

Die Sinnesphysiologie.

In: KOLB, E. (Hrsg.): Lehrbuch der Physiologie der Haustiere.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, Bd. 2, 5. Aufl., S. 927

KOLIATSOS, V. E., u. D. L. PRICE (1996):

Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death.

Brain Pathol. 6, 447 - 465.

KORSCHING, S. (1993):

The neurotrophic factor concept: A Reexamination.

J. Neurosci. 13, 2739 - 2748.

KREUTZBERG, G. W. (1982):

Acute neural reaction to injury.

In: NICHOLLS, J. G. (eds.): Repair and Regeneration of the Nervous System.

Dahlem Konferenzen 1982, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 57 - 69

KREUTZBERG, G. W. (1996):

Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.

Trends Neurosci. 19, 312 - 318.

LANG, J. (1981):

Optic nerve, topographic anatomy.

In: SAMII, M., u. P. J. JANETTA (eds.): The Cranial Nerves.

Springer Verlag, Berlin, S. 77

LANGER, T. P., u. R. D. LUND (1974):

The upper layers of the superior colliculus of the rat: a Golgi study.

J. Comp. Neurol. 158, 418 - 435.

LASEK, R. J., u. M. J. KATZ (1987):

Mechanism at the axon tip regulate metabolic processes critical to axonal elongation.

In: SEIL, F. J., E. HERBERT u. B. M. CARLSON (eds.): Progress in Brain Research.

Elsevier Science Publishers B. V., Biomedical Division, 71, S. 49 - 60

LASEK, R. J., u. S. T. BRADY (1982):

The structural hypothesis of axonal transport: two classes of moving elements.

In: WEISS, G. D. (eds.): Axonal Transport.

Springer Verlag, Berlin, S. 397 - 405

LAU, K. C., K.-F. SO u. D. TAY (1992):

Postnatal development of Type I retinal ganglion cells in hamsters: a Lucifer Yellow study.

J. Comp. Neurol. 315, 375 - 381.

LAU, K. C., K.-F. SO u. E. Y. P. CHO (1991):

Morphological changes of retinal ganglion cells regenerating axons along peripheral nerve grafts: a Lucifer Yellow and silver staining study.

Restor. Neurol. Neurosci. 3, 235 - 246.

LE GROS CLARK, W. E. (1942):

The problem of neuronal regeneration in the central nervous system. I. The influence of spinal ganglia and nerve fragments grafted in the brain.

J. Anat. 77, 20 - 48.

LE GROS CLARK, W. E. (1943):

The problem of neuronal regeneration in the central nervous system. II. The insertion of peripheral nerve stumps into the brain.

J. Anat. 77, 251 - 259.

LEI, J. L., K. C. LAU, K.-F. SO, E. Y. P. CHO u. D. TAY (1995):

Morphological plasticity of axotomized retinal ganglion cells following intravitreal transplantation of a peripheral nerve segment.

J. Neurocytol. 24, 497 - 506.

LETOURNEAU, P. C. (1992):

Integrins and N-Cadherin are adhesive molecules involved in growth cone migration.

In: LETOURNEAU, P. C., S. B. KATER u. E. R. MACAGNO (eds.): The Nerve Growth Cone.

Raven Press, New York, S. 181 - 193

Literaturverzeichnis

LETOURNEAU, P. C., S. B. KATER u. E. R. MACAGNO (1992):
The Nerve Growth Cone.
Raven Press, New York

LEVI-MONTALCINI, R. (1987):
The nerve growth factor 35 years later.
Science 237, 1154 - 1162.

LIEBERMAN, A. R. (1971):
The axon reaction: A review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. Int.
Dev. Neurobiol. 14, 49 - 124.

LINDHOLM, D., R. HEUMANN, M. MEYER u. H. THOENEN (1987):
Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non neuronal cells of rat sciatic nerve.
Nature 330, 658 - 659.

LIUZZI, F. J., u. R. J. LASEK (1987):
Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway.
Science 237, 642 - 645.

LOGAN, A., M. BERRY, A. M. GONZALEZ, S. A. FRAUTSCHY, M. B. SPORN u. A. BAIRD
(1994):
Effects of transforming growth factor $\alpha 1$ on scar production in the injured central nervous system of
the rat.
Eur. J. Neurosci. 6, 355 - 363.

LONGO, F. M., M. MANTHORPE, S. D. SKAPER, G. LUNDBORG u. S. VARON (1983):
Neuronotrophic activities accumulate *in vivo* within silicone nerve regeneration chambers.
Brain Res. 261, 109 - 117.

LOWENSTEIN, D. H., u. L. ARSENAULT (1996):
Dentate granule cell layer collagen explant cultures: spontaneous axonal growth and induction by
brain-derived neurotrophic factor or basic fibroblast growth factor.
Neuroscience 74, 1197 - 1208.

LUND, R. D. (1978):
Development and plasticity of the brain.
Oxford University Press, New York

LUO, Y., D. RAIBLE u. J. A. RAPER (1993):
Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones.
Cell 75, 217 - 227.

MAC GREGOR, R. J., S. K. SHARPLESS u. M. W. LUTTGES (1975):
A pressure vessel model for nerve compression.
J. Neurol. Sci. 24, 299 - 304.

MADISON, R., M. R. MOORE u. R. L. SIDMAN (1984):

Retinal ganglion cells and axons survive optic nerve transection.

Int. J. Neurosci. 23, 15 - 32.

MAFFEI, L., u. V. H. PERRY (1988):

The axon initial segment as a possible determinant of retinal ganglion cell dendritic geometry.

Brain Res. 496, 185 - 194.

MAXWELL, W. L., u. D. I. GRAHAM (1997):

Loss of axonal microtubules and neurofilaments after stretch-injury to guinea pig optic nerve fibers.

J. Neurotrauma. 14, 603 - 614.

McCONNELL, P., u. M. BERRY (1982):

Regeneration of ganglion cell axons in the adult mouse retina.

Brain Res. 241, 362 - 365.

McKEON, R. J., R. C. SCHREIBER, J. S. RUDGE u. J. SILVER (1991):

Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes.

J. Neurosci. 11, 3398 - 3411.

McKERRACHER, L., M. VIDAL-SANZ u. A. J. AGUAYO (1990):

Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats.

J. Neurosci. 10, 641 - 648.

MEY, J. (1994):

Untersuchungen zur neurotrophen Wirksamkeit regenerationspezifischer, löslicher Proteine des peripheren Nervensystems der Ratte.

Tübingen, Eberhard-Karls-Univ., Fak. Biol., Diss.

MEY, J., u. S. THANOS (1993):

Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats *in vivo*.

Brain Res. 602, 304 - 317.

MILES, F. A. (1972):

Centrifugal control of the avian retina. III. Effects of electrical stimulation of the isthmo-optic tract on the receptive field properties of the retinal ganglion cells.

Brain Res. 48, 115 - 129.

MILLER, N. M., u. M. OBERDORFER (1981):

Neuronal and neuroglial responses following retinal lesions in the neonatal rats.

J. Comp. Neurol. 202, 493 - 504.

MISANTONE, L. J., M. GERSHENBAUM u. M. MURRAY (1984):

Viability of retinal ganglion cells after optic nerve crush in adult rats.

J. Neurocytol. 13, 449 - 465.

Literaturverzeichnis

MOORE, S., u. S. THANOS (1996):

The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration.
Prog. Neurobiol. 48, 441 - 460.

MUCHNICK, N., u. E. HIBBARD (1980):

Avian retinal ganglion cells resistant to degeneration after optic nerve lesion.
Exp. Neurol. 68, 205 - 216.

MURPHY, E. H., A. M. GRIGONIS, T. E. HAYDEN, D. TASHAYYOD u. M. WILKES (1988):

The effects of ablation of visual cortex in neonatal rabbits on the organization of retinothalamic and retinopretectal projections.
Dev. Brain Res. 38, 27 - 35.

NISSL, F. (1892):

Über die Veränderungen der Ganglienzellen am Facialiskern des Kaninchens nach Ausspreißung der Nerven.
Allg. Z. Psychiatr. 48, 197.

NOBLE, L. J., u. D. S. MAXWELL (1983):

Blood-spinal cord barrier response to transection.
Exp. Neurol. 79, 188 - 199.

NYGREN, L.-G., L. OLSEN u. A. SEIGER (1971):

Regeneration of monoamine-containing axons in the developing and adult spinal cord of the rat following intraspinal 6-OH-dopamine injections or transections.
Histochemie 28, 1 - 15.

OORSCHOT, D. E., u. D. G. JONES (1990):

Axonal regeneration in the mammalian central nervous system - a critique of hypothesis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

OLEN-SAND, A., M. CATSICAS, J. K. STAPLE, K. A. JONES, G. AYALA, J. KNOWLES, G. GRENNINGLOH u. S. CATSICAS (1993):

Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*.
Nature 364, 445 - 448.

PEICHL, L. (1989):

Alpha and delta ganglion cells in the rat retina.
J. Comp. Neurol. 286, 120 - 139.

PELLEGRINO, R. G., M. J. POLITIS, J. M. RITCHIE u. P. S. SPENCER (1986):

Events in degenerating cat peripheral nerve: induction of Schwann cell S-phase and its relation to nerve fiber degeneration.
J. Neurocytol. 15, 17 - 28.

PELLEGRINO, R. G., u. P. S. SPENCER (1985):

Schwann cell mitosis in response to regenerating peripheral axons *in vivo*.
Brain Res. 341, 16 - 25.

PERRY, V. H. (1979):

The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study.
Proc. R. Soc. Lond. B. 204, 363 - 375.

PERRY, V. H. (1981):

Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina.
Neuroscience 6, 931 - 944.

PERRY, V. H., M. C. BROWN u. S. GORDON (1987):

The macrophage response to central and peripheral nerve injury.
J. Exp. Med. 165, 1218 - 1223.

PERRY, V. H., u. M. C. BROWN (1992):

Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair.
Bio Essays 14, 401 - 406.

PERRY, V. H., u. M. WALKER (1980):

Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat.
Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 208, 415 - 431.

PETERSON, B. B., u. D. M. DACEY (1998):

Morphology of human retinal ganglion cells with intraretinal axon collaterals.
Vis. Neurosci. 15, 377 - 387.

PFENNIGER, K. H. (1979):

Subplasmalemmal vesicle clusters: real or artifact?

In: RASH, J. E., u. C. S. HUDSON (eds.): Freeze fracture: methods, artifacts, and interpretations.
Raven Press, New York, S. 71 - 80

PFENNIGER, K. H. u. L. B. FRIEDMAN (1993):

Sites of plasmalemmal expansion in growth cones.
Dev. Brain Res. 71, 181 - 192.

PFENNIGER, K. H., B. A. DE LA HOUSSAYE, L. FRAME, S. HELMKE, R. O. LOCKERBIE,
K. LOHSE, V. MILLER, P. NEGRE-AMINOU u. M. R. WOOD (1992):

Biochemical dissection of plasmalemmal expansion at the growth cone.

In: LETOURNEAU, P. C., S. B. KATER u. E. R. MACAGNO (eds.): The Nerve Growth Cone.
Raven Press, New York, S. 111 - 123

PFENNIGER, K. H., u. M. P. JOHNSON (1983):

Membrane biogenesis in the sprouting neuron. I. Selective transfer of newly synthesized phospholipid into the growing neurite.
J. Cell Biol. 97, 1038 - 1042.

PFENNIGER, K. H., u. M.-F. MAYLIÉ-PFENNIGER (1981):

Lectin labelling of sprouting neurons. II. Relative movement and appearance of glycoconjugates during plasmalemmal expansion.
J. Cell Biol. 89, 547 - 559.

Literaturverzeichnis

POLITIS, M. J., u. P. S. SPENCER (1986):

Regeneration of rat optic axons into peripheral nerve grafts.
Exp. Neurol. 91, 52 - 59.

POLYAK, S. (1957):

The Vertebrate Visual System.
Chicago University Press

POTTS, R. A., B. DREHER u. M. R. BENNETT (1982):

The loss of ganglion cells in the developing retina of the rat.
Dev. Brain Res. 3, 481 - 486.

PROVIS, J. M., D. VAN DRIEL, F. A. BILLSON u. P. RUSSELL (1985):

Human fetal optic nerve: overproduction and elimination of retinal axons during development.
J. Comp. Neurol. 238, 92 - 100.

RAFF, M. C., E. R. ABNEY u. R. H. MILLER (1984):

Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve.
Dev. Biol. 106, 53 - 60.

RAGER, G., u. U. RAGER (1976):

Generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken.
Exp. Brain Res. 25, 551 - 553.

RAISMAN, G. (1985):

Specialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronasal axons to reinnervate central neurons.
Neuroscience 14, 237 - 254.

RAJAKUMAR, N., K. ELISEVICH u. B. A. FLUMERFELT (1993):

Biotinylated dextran: a versatile anterograde and retrograde neuronal tracer.
Brain Res. 607, 47 - 53.

RAKIC, P., u. K. P. RILEY (1983):

Regulation of axon number in primate optic nerve by prenatal binocular competition.
Nature 305, 135 - 137.

RAMOA, A. S., G. CAMPBELL u. C. J. SHATZ (1987):

Transient morphological features of identified ganglion cells in living fetal and neonatal retina.
Science 237, 522 - 525.

RAMON Y CAJAL, S. (1968):

Degeneration and Regeneration of the Nervous System.
(Facsimile of the 1928 edition) Hafner, London.

RAMON Y CAJAL, S. (1914):

Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso.
Imprenta de Hijos de Nicolás Moya; Madrid, Vol. II, 203 - 218

RAMON Y CAJAL, S. (1928):

Degeneration and Regeneration of the Nervous system.

In: May R. M. (eds.)

Oxford Press, London, S. 583 - 596

RAYMOND, P. A., u. S. S. EASTER, JR. (1983):

Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. I. Location of germinal cells and numbers of neurons produced.

J. Neurosci. 3, 1077 - 1091.

REIER, P. J. (1986):

Gliosis following the CNS injury: the anatomy of astrocytic scars and their influences on axonal elongation.

Astrocytes 3, 263 - 324.

REIER, P. J., L. J. STENSAAS u. L. GUTH (1983):

The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system.

In: KAO, C. C., R. P. BUNGE u. P. J. REIER (eds.): Spinal Cord Reconstruction.

Raven Press, New York, S. 163 - 195

RICHARDSON, P. M., V. M. ISSA u. S. SHEMIE (1982a):

Regeneration of axons in the rat optic nerve.

J. Neurocytol. 11, 949 - 966.

RICHARDSON, P. M., V. M. K. ISSA u. A. J. AGUAYO (1982b):

Peripheral nerve autografts to the rat spinal cord; studies with axonal tracing methods.

Brain Res. 237, 147 - 162.

RIO, J. P., J. REPERANT, R. WARD, J. PEYRICHOUX u. N. VESSELKIN (1989):

A preliminary description of the regeneration of optic nerve fibres in a reptile, *Vipera aspis*.

Brain Res. 479, 151 - 156.

RODIECK, R. W., K. F. BINMOELLER u. J. DINEEN (1985):

Parasol and midget ganglion cells of the human retina.

J. Comp. Neurol. 233, 115 - 132.

ROGERS, L. J., u. F. A. MILES (1972):

Centrifugal control of the avian retina. V. Effects of lesions of the isthmo-optic nucleus on visual behaviour.

Brain Res. 48, 147 - 156.

ROTSHENKER, S., S. AAMAR u. V. BARAK (1992):

Interleukin-1 activity in lesioned peripheral nerve.

J. Neuroimmunol. 39, 75 - 80.

RUPPENTHAL, M. (1980):

Changes of the central nervous system in herpes zoster.

Acta Neuropathol. 52, 59 - 68.

Literaturverzeichnis

SALZER, J. L., R. P. BUNGE u. L. GLASER (1980):

Studies of Schwann cell proliferation. III. Evidence for the surface localization of the neurite mitogen.

J. Cell Biol. 84, 767 - 778.

SAUTTER, J. (1991):

Graduelle Quetschung des Nervus opticus bei der Ratte: Funktionserholung und Wirkung des Gangliosids GM1.

München, Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Biologie, Diss.

SAWAI, H., D. B. CLARKE, P. KITTLEROVA, G. M. BRAY u. A. J. AGUAYO (1996):

Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells.

J. Neurosci. 16, 3887 - 3849.

SCHECTERSON, L. C., u. M. BOTHWELL (1992):

Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons.

Neuron 9, 449 - 463.

SCHERER, J., u. J. SCHNITZER (1991):

Intraorbital transection of the rabbit optic nerve: Consequence for ganglion cells and neuroglia in the retina.

J. Comp. Neurol. 312, 175 - 192.

SCHERER, S. S., u. S. S. EASTER (1984):

Degenerative and regenerative changes in the trochlear nerve of goldfish.

J. Neurocytol. 13, 519 - 565.

SCHLOTE, W. (1970):

Nervus opticus und experimentelles Trauma.

Monogr. Gesamtgeb. Neurol. Psychiatr. 131, 1 – 156.

SCHMIDT, J. T., u. D. L. EDWARDS (1983):

Activity sharpens the map during the regeneration of the retinotectal projection in goldfish.

Brain Res. 269, 29 - 39.

SCHMIDT-KASTNER, R., u. U. T. EYSEL (1994):

Ischemic damage visualized in flat mounts of rat retina after photochemically induced thrombosis.

Brain Res. Bull. 34, 487 - 491.

SCHOBBER, W., u. H. GRUSCHKA (1977):

Die Ganglienzellen der Retina der Albinoratte: Eine qualitative und quantitative Studie.

Z. mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig, 91, 397 - 414.

SCHWAB, M. E. (1990):

Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS.

Trends Neurosci. 13, 453 - 456.

SCHWAB, M. E., u. P. CARONI (1988):

Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading *in vitro*.

J. Neurosci. 8, 2381 - 2393.

SEEGER, J. (1995):

Degenerative und regenerative Prozesse in visuellen und visuell assoziierten Hirnstrukturen von Ratte und Maus: Plastische Reaktionen in der frühen Ontogenese und nach experimentellen Eingriffen.

Habil.-Schrift, Veterinärmed. Fak. Univ. Leipzig.

SEFTON, A. J. (1968):

The innervation of the lateral geniculate nucleus and anterior colliculus in the rat.

Vis. Res. 8, 867 - 881.

SEFTON, A. J., u. B. DREHER (1985):

Visual System.

In: PAXINOS, G. (eds.): The Rat Nervous System. Second Edition.

Academic Press, S. 833 - 880

SELLES-NAVARRO, I., M. P. VILLEGAS-PEREZ, M. SALVADOR-SILVA, J. M. RUIZ-GOMEZ u. M. VIDAL-SANZ (1996):

Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative *in vivo* study.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37, 2002 - 2014.

SENDTER, M., K. A. STÖCKLI u. H. THOENEN (1992):

Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration.

J. Cell Biol. 118, 139 - 148.

SENGELAUB, D. R., R. P. DOLAN u. B. L. FINLAY (1986):

Cell generation, death and retinal growth in the development of the hamster retinal ganglion cell layer.

J. Comp. Neurol. 246, 527 - 543.

SHAW, G., u. D. BRAY (1977):

Movement and extension of isolated growth cones.

Exp. Cell Res. 104, 55 - 62.

SIEVERS, J., B. HAUSMANN u. M. BERRY (1989):

Fetal brain grafts rescue adult retinal ganglion cells from axotomy-induced cell death.

J. Comp. Neurol. 281, 467 - 478.

SIEVERS, J., B. HAUSMANN, K. UNSICKER u. K. BERRY (1987):

Fibroblast growth factor promotes the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve.

Neurosci. Lett. 76, 157 - 162.

Literaturverzeichnis

SILVER, J., S. E. LORENZ, D. WAHLSTEIN u. J. COUGHLIN (1982):

Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies *in vivo*, on the role of preformed glial pathways.

J. Comp. Neurol. 210, 10 - 29.

SKENE, J. H. P. (1989):

Axonal growth-associated proteins.

Ann. Rev. Neurosci. 12, 127 - 156.

SKENE, J. H. P., R. D. JACOBSON, G. J. SNIPES, C. B. MCGUIRE, J. J. NORDEN u. J. A. FREEMAN (1986):

A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes.

Science 233, 783 - 786.

SKENE, J. H. P., u. M. WILLARD (1981):

Characteristics of growth-associated polypeptides in regenerating toad retinal ganglion cell axons.

J. Neurosci. 1, 419 - 426.

SKOFF, R. P., D. L. PRICE u. A. STOCKS (1976a):

Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. I. Cell proliferation.

J. Comp. Neurol. 169, 291 - 312.

SKOFF, R. P., D. L. PRICE u. A. STOCKS (1976b):

Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. II. Time of origin.

J. Comp. Neurol. 169, 313 - 334.

SLAVIN, K. V., M. DUJOVNY, G. SOEIRA u. J. I. AUSMAN (1994):

Optic canal: microanatomic study.

Skull Base Surg. 4, 136.

SMITH, G. M., R. H. MILLER u. J. SILVER (1986):

Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation.

J. Comp. Neurol. 251, 23 - 43.

SO, K. F., u. H. K. YIP (1998):

Regenerative capacity of retinal ganglion cells in mammals.

Vision Res. 38, 1525 - 1535.

SO, K.-F., u. A. J. AGUAYO (1985):

Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats.

Brain Res. 328, 349 - 354.

SPEIDEL, C. C. (1964):

In vivo studies of myelinated nerve fibers.

Int. Rev. Cytol. 16, 137.

SPERRY, R. W. (1944):

Optic nerve regeneration with return of vision in anurans.
J. Neurophysiol. 7, 57 - 69.

SPERRY, R. W. (1955):

Functional regeneration in the optic system.
In: WINDLE, W. F. (eds.): Regeneration in the central nervous system.
Thomas, Springfield, S. 66 - 76

SPRINGER, A. D. (1983):

Centrifugal innervation of goldfish retina from ganglion cells of the nervus terminalis.
J. Comp. Neurol. 214, 404 - 415.

SPRINGER, A. D., K. D. MOREL, S. L. GROBMAN u. B. R. WILSON (1989):

Axonal redirection at the dorsoventral intraretinal boundary.
J. Comp. Neurol. 283, 405 - 414.

STEPHENSON, D. T., K. RASH u. J. A. CLEMENS (1992):

Amyloid precursor protein accumulates in regions of neurodegeneration following focal cerebral ischemia in the rat.
Brain Res. 593, 128 - 135.

STEVENSON, J. A. (1985):

Growth of optic tract axons in the graft in hamsters.
Exp. Neurol. 87, 446 - 457.

STEVENSON, J. A. (1987):

Growth of retinal ganglion cell axons following optic nerve crush in adult hamsters.
Exp. Neurol. 97, 77 - 89.

STOLL, G., J. W. GRIFFIN, C. Y. LI u. B. D. TRAPP (1989):

Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. Participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation.
J. Neurocytol. 18, 671 - 683.

STONE, J. (1965):

A quantitative analysis of the distribution of ganglion cells in the cat's retina.
J. Comp. Neurol. 124, 337 - 352.

STONE, J., u. Y. FUKUDA (1974):

The naso-temporal division of the cat's retina re-examined in terms of W-, X- and Y-cells.
J. Comp. Neurol. 155, 377 - 394.

STROBEL, G., u. C. A. O. STUERMER (1994):

Growth cones of regenerating retinal axons contact a variety of cellular profiles in the transected goldfish optic nerve.
J. Comp. Neurol. 346, 435 - 448.

Literaturverzeichnis

STUERMER, C. A. O. (1992):

Die Navigation des Wachstumskegels und die Verschaltung des Nervennetzes im Gehirn. Verh. Ges. Dtsch. Na.forsch. Ärzte, 117. Vslg. Aachen,. S. 275-297

STUERMER, C. A. O., u. S. S. EASTER (1984):

A comparison of the normal and regenerated retinotectal pathways of goldfish.
J. Comp. Neurol. 223, 57 - 76.

SUNDERLAND, S. (1968):

Nerves and nerve injuries.
Willams and Wilkins, Baltimore

SUNDERLAND, S. (1978):

Nerve and Nerve Injuries.
2nd edn. Longman U.S.A., S. 69 - 133

SVENDEGAARD, N.-A., Å BJÖRKLUND u. U. STENEVI (1976):

Regeneration of central cholinergic neurones in the adult rat brain.
Brain Res. 102, 1 - 22.

THANOS, S. (1988a):

Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments.
Cell Tissue Res. 254, 599 - 609.

THANOS, S. (1988b):

Morphology of ganglion cell dendrites in the albino rat retina: An analysis with fluorescent carbocyanine dyes.
J. Hirnforsch. 29, 617 - 631.

THANOS, S. (1991):

Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injured-induced neuronal degeneration.
Neurosci. Lett. 127, 108 - 112.

THANOS, S., C. PAVLIDIS, J. MEY u. J. H. THIEL (1992):

Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells.
Eye Res. 55, 101 - 117.

THANOS, S., J. MEY u. M. WILD (1993):

Treatment of adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degeneration and enhances axonal regeneration *in vivo* and *in vitro*.
J. Neurosci. 13, 455 - 466.

THANOS, S., J.-M. ROHRBACH u. H.-J. THIEL (1991):

Postmortem preservation of ganglion cells in the human retina: A morphometric investigation with the carbocyanine dye DiI.
Retina 11, 318 - 327.

THANOS, S., M. BAEHR, Y. A. BARDE u. J. VANSELOW (1989):

Survival and axonal elongation of adult rat retinal ganglion cells: *In vitro* effects of lesioned sciatic nerve and brain derived neurotrophic factor (BDNF).

Eur. J. Neurosci. 1, 19 - 26.

THANOS, S., u. A. J. AGUAYO (1988):

Changes in dendrites of adult rat ganglion cells regenerating axons into peripheral nerve grafts.

In: FLOHR, H. (eds.): Postlesion Neural Plasticity.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

THANOS, S., u. F. BONHOEFFER (1987):

Axonal arborization in the developing chick retinotectal system.

J. Comp. Neurol. 261, 155 - 164.

THANOS, S., u. J. VANSELOW (1990):

Fetal tectal transplants in the cortex of adult rats become innervated both by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts and by cortical neurons.

Restor. Neurol. Neurosci. 2, 63 - 75.

THANOS, S., u. Y. v. BOXBERG (1989):

Factors influencing regeneration of retinal ganglion cells.

Metab. Brain Disease 4, 67 - 72.

THERY, C., u. M. MALLAT (1993):

Influence of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on the growth of microglial cells in primary cultures of mouse cerebral cortex: Involvement of colony-stimulating factor 1.

Neurosci. Lett. 150, 195 - 199.

THOENEN, H., C. BANDTLOW u. R. HEUMANN (1987):

The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery.

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109, 145 - 178.

TOHYAMA, K., u. C. IDE (1984):

The localization of laminin and fibronectin on the Schwann cell basal lamina.

Arch. Hist. Japn. 47, 519 - 532.

TOSNEY, K. W., u. L. T. LANDMESSER (1985):

Growth cone morphology and trajectory in the lumbosacral region of the chick embryo.

J. Neurosci. 5, 2345 - 2358.

TOYOSHIMA, I., M. SUGAWARA, K. KATO, C. WADA, K. HIROTA, K. HASEGAWA, H. KOWA, M. P. SHEETS u. O. MASAMUNE (1998):

Kinesin and cytoplasmic dynein in spinal spheroids with motor neuron disease.

J. Neurol. Sci. 159, 38 - 44.

USAI, C., G. M. RATTO u. S. BISTI (1991):

Two systems of branching axons in monkey's retina.

J. Comp. Neurol. 308, 149 - 161.

Literaturverzeichnis

VARON, S., M. MANTHORPE, F. M. LONGO u. L. R. WILLIAMS (1983):

Growth factors in regeneration of neural tissues.

In: SEIL, F. J. (eds.): Nerve, organ, and tissue regeneration: research perspectives.

Academic, New York, S. 127 - 155

VARON, S., u. R. P. BUNGE (1978):

Trophic mechanisms in the peripheral nervous system.

Annu. Rev. Neurosci. 1, 327 - 361.

VEENMAN, C. L., A. REINER u. M. G. HONIG (1992):

Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies.

J. Neurosci. Meth. 41, 239 - 254.

VIDAL-SANZ, M., G. M. BRAY, M. P. VILLEGAS-PEREZ, S. THANOS u. A. J. AGUAYO (1987):

Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat.

J. Neurosci. 7, 2894 - 2909.

VIDAL-SANZ, M., P. VILLEGAS-PEREZ, G. M. BRAY u. A. J. AGUAYO (1988):

Persistent retrograde labelling of adult rat retinal ganglion cells with carbocyanine dye DiI.

Exp. Neurol. 102, 92 - 101.

VILLEGAS-PEREZ, M. P., M. VIDAL-SANZ u. A. J. AGUAYO (1986):

Effects of axotomy and PN grafting on adult rat retinal ganglion cells.

Soc. Neurosci. 12, 700 (Abstr.).

VILLEGAS-PEREZ, M. P., M. VIDAL-SANZ, G. M. BRAY u. A. J. AGUAYO (1988a):

Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats.

J. Neurosci. 8, 265 - 280.

VILLEGAS-PEREZ, M. P., M. VIDAL-SANZ, G. M. BRAY u. A. J. AGUAYO (1988b):

Retinal ganglion cell death after axotomy is influenced by the distance between the lesion and the neuronal somata.

Soc. Neurosci. 14, 673 (Abstr.).

VON BARTHELD, C. S. (1998):

Neurotrophins in the developing and regenerating visual system.

Histol. Histopathol. 13, 437 - 459.

WANG, G.-Y., K.-I. HIRAI u. H. SHIMADA (1992b):

The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum-treated nerve grafts.

Brain Res. 570, 116 - 125.

WANG, G.-Y., K.-I. HIRAI, H. SHIMADA, S. TAJI u. S.-Z. ZHONG (1992a):
Behavior of axons, Schwann cells and perineural cells in nerve regeneration within transplanted nerve grafts: Effects of anti-laminin and anti-fibronectin antisera.
Brain Res. 583, 216 - 226.

WÄSSLE, H., M. H. CHUN u. F. MÜLLER (1987):
Amacrine cells in the ganglion cell layer of the cat retina.
J. Comp. Neurol. 265, 391 - 408.

WATANABE, M., u. R. W. RODIECK (1989):
Parasol and midget ganglion cells of the primate retina.
J. Comp. Neurol. 289, 434 - 454.

WATANABE, M., H. SAWAI u. Y. FUKUDA (1993):
Number distribution and morphology of retinal ganglion cells with axons regenerated into peripheral nerve graft in adult cats.
J. Neurosci. 13, 2105 - 2117.

WEIBEL, D., D. CADELLI u. M. E. SCHWAB (1994):
Regeneration of lesioned rat optic nerve fibres is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors.
Brain Res. 642, 259 - 266.

WEISS, E. (1990):
Gesamttod.
In: STÜNZI, H., u. E. WEISS (Hrsg.): Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin.
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 8. Aufl., S. 378

WEISS, P., u. H. H. HISCOE (1948):
Experiment on the mechanism of nerve growth.
J. Exp. Zool. 107, 315 - 393.

WILKINSON, A. E., L. R. BRIDGES u. S. SIVALOGANATHAN (1999):
Correlation of survival time with size of axonal swellings in diffuse axonal injury.
Acta Neuropathol. 98, 197 - 202.

WINDLE, W. F. (1956):
Regeneration of axons in the vertebrate central nervous system.
Physiol. Rev. 36, 427 - 440.

WISNIEWSKI, H. M., J. W. SHEK, S. GRUCA u. J. A. STURMAN (1984):
Aluminium-induced neurofibrillary changes in axons and dendrites.
Acta Neuropathol. 63, 190 - 197.

WONG, R. O. L. (1990):
Differential growth and remodelling of ganglion cell dendrites in the postnatal rabbit retina.
J. Comp. Neurol. 294, 109 - 132.

Literaturverzeichnis

WONG, R. O. L., u. A. HUGHES (1987):

Role of cell death in the topogenesis of neuronal distributions in the developing cat retinal ganglion cell layer.

J. Comp. Neurol. 262, 496 - 511.

WOOD, P. M., u. R. P. BUNGE (1975):

Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells.

Nature 256, 662 - 664.

WUJEK, J., u. P. REIER (1984):

Astrocytic membrane morphology: differences between mammalian and amphibian astrocytes after axotomy.

J. Comp. Neurol. 222, 607 - 619.

YAMADA, K. M., B. S. SPOONER u. N. K. WESSELLS (1970):

Axon growth: roles of microfilaments and microtubules.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 66, 1206.

YAMADA, K. M., B. S. SPOONER u. N. K. WESSELLS (1971):

Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells.

J. Cell Biol. 49, 614 - 635.

YAMADORI, T. (1981):

An experimental anatomical study on the topographic termination of the optic nerve fibers in the rat.

J. Hirnforsch. 22, 313 - 326.

YOSHIDA, K., u. F. H. GAGE (1991):

Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes.

Brain Res. 538, 118 - 126.

ZENG, B.-Y., P. N. ANDERSON, G. CAMPBELL u. A. R. LIEBERMAN (1994):

Regenerative and other response to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intraorbital optic nerve.

J. Anat. 185, 643 - 661.

ZHANG, Z.-W., u. M. DECHÊNES (1997):

Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: A single-cell labeling study.

J. Neurosci. 17, 6365 - 6379.

ZHOU, X. F., R. A. RUSH u. E. M. McLACHLAN (1996):

Differential expression of the p75 nerve growth factor receptor in glia and neurons of the rat dorsal root ganglia after peripheral nerve transection.

J. Neurosci. 16, 2901 - 2911.

ZIV, N. E., u. M. E. SPIRA (1997):

Localized and transient elevations of intracellular Ca^{2+} induce the dedifferentiation of axonal segments into growth cones.

J. Neurosci. 17, 3568 - 3579.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. Johannes Seeger verdanke ich die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens. In den Jahren bis zur Fertigstellung der Dissertation war er ein unentbehrlicher Ansprechpartner bei der Überwindung sich ergebender Probleme und ein verständiger und hilfreicher Betreuer. Hierfür möchte ich mich bei ihm ganz besonders bedanken.

Außerdem gebührt mein Dank **Herrn Dr. rer. nat. Johannes Kacza**, der mir wegweisend Einblicke in Fragen der Versuchsmethodik gewährte und dadurch für diese Arbeit wichtige methodische Grundlagen vermittelte. Die verlässliche und konstruktive Zusammenarbeit gipfelte in seiner Betreuung bei der Arbeit am Licht- und Elektronenmikroskop sowie den Anregungen und Vorschlägen bei der Auswertung und der Diskussion der Ergebnisse.

An dieser Stelle möchte ich auch drei wissenschaftlichen Mitarbeitern danken, die mir ihre besondere Hilfe und Unterstützung zuteil werden ließen. Ich konnte auf die jahrelangen Erfahrungen und Hinweise im Bereich der Histologie von **Frau Dr. rer. nat. Gerda Gutte** zurückgreifen. **Frau Dr. med. vet. Martina Menzel** und **Herrn Dr. med. vet. Thomas Ludewig** danke ich für die kooperative und freundschaftliche Mitarbeit im Rahmen meiner Arbeit, bei den histologischen Kursen und für das freundliche Arbeitsklima.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des histologischen Labors **Frau Gabriele Lindner** und **Frau Andrea Schwarze** für ihre praktische Hilfe und für die gute Zusammenarbeit bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Herrn Dr. med. vet. Wolfgang Frick bin ich für sein freundschaftliches Entgegenkommen während meiner Studien- und Promotionszeit dankbar.

Zuletzt möchte ich meinen ganz persönlichen Dank meiner Familie aussprechen, die mich immer wieder zu diesem Vorhaben ermunterte und mir ihre finanzielle und materielle Unterstützung zusicherte: **Frau Christa Hoffmann, Frau Dr. Angela Hoffmann, Herr Ulrich Rosenau** und **Familie Nickel**.

Andreas Nickel - Graças!